

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

V межвузовская студенческая конференция

**СТУДЕНЧЕСКИЙ
БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ
2025**

5-7 апреля 2025 г.

Материалы конференции

УДК 577
ББК 28.07

*Оргкомитет благодарит руководство Биологического факультета
МГУ за помощь в проведении конференции*

Оргкомитет конференции

А.Г. Катруха (председатель оргкомитета), Д.В. Серебряная
(ответственный секретарь), М.В. Судницына, М.В. Уфимцева,
Д.А. Адашева, В.В. Воинова, В.М. Шатов, А.И. Заболотский,
А.С. Рыжавская, Л.К. Муранова, Н.А. Ломов, М.А. Замотина,
В.А. Катруха, И. Гомжин Н.Н. Киреева, К.А. Богоцкой,

СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2025

V межвузовская студенческая конференция: 5-7 апреля 2025 г.,
Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет.

Материалы конференции/ Отв. ред. А.Г. Катруха.

Сост. В.М. Шатов

Научное издание

V межвузовская студенческая конференция
СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2025

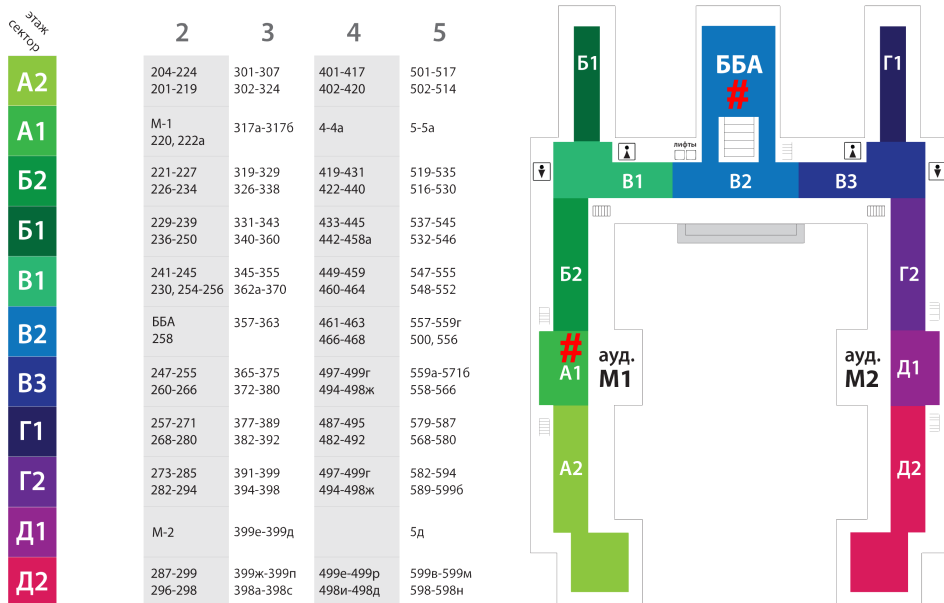
5-7 апреля 2025 г.

Составление и верстка: В.М. Шатов
Дизайн обложки: У Т.С., Болотченков Н.А.
Дизайн: У Т.С., Болотченков Н.А.

УДК 577
ББК 28.07

Схема здания Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Схема здания Биологического факультета



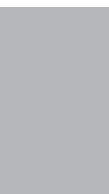
Источник: <http://www.bio.msu.ru> (с модификациями)

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

Контакты организаторов конференции



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



Секция: Доклады

Д1. мРНК с короткими 3' нетранслируемыми областями представлены в транскриптоме человека и имеют особенности трансляции

М.Д. Лоев (bisy201072@gmail.com)^{1,2}, А.С. Жарикова¹, С.Е. Дмитриев^{1,3}, Е.З. Алкалаева^{2,4}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, Москва

³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

⁴Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Россия, Москва

Введение. 3' нетранслируемая область (3' НТО) мРНК расположена между стоп кодоном и поли(А) хвостом и играет важную роль в регуляции трансляции, локализации и деградации мРНК эукариот. Средняя длина 3' НТО большинства эукариот составляет сотни нуклеотидов. Некоторые протисты имеют мРНК с аномально короткими 3' НТО. Однако специфика мРНК млекопитающих с короткими 3' НТО оставалась не исследованной. Мы проанализировали представленность таких мРНК в транскриптоме человека и проверили влияние малой длины 3' НТО на эффективность трансляции.

Методы. Мы разбили транскрипты человека из GENCODE на группы по типу стоп кодона и длине 3' НТО. Построили распределение длин 3' НТО и сравнили группы между собой с помощью анализа обогащения. Для изучения влияния длины 3' НТО на трансляцию мы измерили скорости трансляции в лизате клеток НЕК293Т на матрицах, кодирующих люциферазу Fluc с или без преждевременного стоп кодона (ПСК), с разными длинами 3' НТО.

Результаты. Медианы длин 3' НТО у человека оказались равны 629-716 нт для разных стоп кодонов с наименьшей для UGA. Распределение мажорных изоформ смещено в сторону более длинных 3' НТО. В транскриптоме человека оказалось много коротких 3' НТО до 150 нт. Среди них в группе кодона UAA перепредставлены гены, связанные с трансляцией. Эффективность *in vitro* трансляции падала при укорачивании 3' НТО. Сквозное чтение ПСК усиливалось в отсутствие 3' НТО и в случае 3' НТО дикого типа (168 нт), но падало в ~2 раза у матриц с более короткими 3' НТО.

Выводы. Итак, мРНК с короткими 3' НТО широко представлены в транскриптоме человека. Укорачивание 3' НТО снижает эффективность трансляции, но при этом снижает и вероятность сквозного чтения.

Выражаю благодарность Шуваловой Е.Ю. за постановку проблемы, предоставление материалов и обсуждение экспериментов. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №23-24-00498, <https://rscf.ru/project/23-24-00498/>.

Д2. Сочетание *in vitro* и *in vivo* модельных систем для исследования гипертрофических изменений в миокарде у взрослых крыс

А.В. Макеева (arinam200231@gmail.com)¹, М.М. Артемьева², Д.А. Адашева¹, Д.В. Серебряная¹

¹*Группа адаптивных клеточных механизмов, кафедра биохимии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

²*Лаборатория защитных систем крови, кафедра физиологии человека и животных, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смертности населения в мире. Многие ССЗ ассоциированы с гипертрофией миокарда, в связи с чем, целью настоящей работы являлась индукция реноваскулярной гипертензии *in vivo* у крыс и подтверждение сохранения гипертрофированного фенотипа у кардиомиоцитов, выделенных в первичную культуру из желудочков сердца модельных животных.

Методы. На крысах линии Wistar были проведены хирургические операции для моделирования реноваскулярной гипертензии, способствующей развитию сердечной гипертрофии. У группы крыс «одна почка одна клипса» (1П1К) осуществляли окклюзию правой почечной артерии и удаляли левую почку. Для группы крыс «одна почка» (1П) производили удаление левой почки. У «ложнооперированных крыс» (ЛО) проводили вскрытие брюшной полости и наложение хирургического шва без каких-либо манипуляций с почками. В течение шести недель после операции у животных измеряли массу тела и артериальное давление, а развитие гипертрофии миокарда оценивали методом морфометрии сердца и по концентрации натрийуретического пептида В типа (BNP) в крови. Суточную экскрецию почек оценивали по клиренсу креатинина. Затем были получены первичные культуры желудочковых кардиомиоцитов, в кондиционированной среде которых определяли концентрацию BNP методом ФИА, после чего характеризовали культуры иммуноцитохимически.

Результаты. В результате работы было прооперировано 68 крыс, смертность животных составила 17,6%. Было выявлено, что к шестой неделе после индукции гипертрофии у крыс группы 1П1К по сравнению с 1П и ЛО группами артериальное давление выше в 1,4 раза; масса левого желудочка увеличена в 1,1 раза, а суточная экскреция возрастает в 1,5 раза. Отличий по массе между группами крыс не обнаружено. Концентрация BNP в сыворотке крови и в кондиционированной среде первичной культуры взрослых желудочковых кардиомиоцитов крыс у группы 1П1К также была выше, чем в контрольных группах в 2 и в 3,4 раза соответственно.

Выводы. Проведенные нами исследования позволяют предположить, что у крыс 1П1К развивается гипертрофия миокарда, а кардиомиоциты, выделенные из их сердец, сохраняют гипертрофированный фенотип в культуре.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 24-25-00051

Д3. Хомогенетическая модель диабета первого типа на объекте *Danio rerio*

Л.Л. Наумов (levanaumov@mail.ru)¹, А.Д. Сергеева^{1,2}, Д.С. Билан^{1,2}

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

²Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Россия, Москва

Введение. *Danio rerio* – удобный объект для моделирования человеческих патологий и поиска подходов к их терапии. Важнейшим преимуществом этой небольшой рыбы является прозрачность тканей на личиночной стадии, что делает возможной прижизненную визуализацию процессов в организме. Мы создали трансгенную линию *D. rerio*, экспрессирующую оксидазу D-аминокислот (DAO) в β -клетках поджелудочной железы. DAO катализирует реакцию превращения D-аминокислот в соответствующие альфа-кетокислоты с образованием пероксида водорода. Добавление экзогенных D-аминокислот позволяет контролируемо индуцировать окислительный стресс, что делает DAO удобным хомогенетическим инструментом для нанесения окислительных повреждений заданному типу клеток. В своей работе мы используем этот принцип для разработки хомогенетической модели диабета первого типа.

Методы. С помощью системы Tol2-транспозона были получены линии рыб *D. rerio*, экспрессирующие DAO совместно с генетически кодируемым флуоресцентным индикатором пероксида водорода HyPer7 в β -клетках поджелудочной железы. Окислительный стресс вызывали добавлением D-норвалина в воду. Динамику индуцированного окислительного стресса оценивали, проводя прижизненную регистрацию флуоресценции HyPer7 у мальков. Концентрацию глюкозы в крови у взрослых особей измеряли с помощью медицинского глюкометра, общий уровень глюкозы у мальков измеряли с помощью коммерческого набора реактивов.

Результаты. Уровень сигнала сенсора HyPer7 в β -клетках поджелудочной железы мальков *D. rerio* достигал пикового уровня на второй день инкубации в среде, содержащей D-норвалин, после чего снижался вплоть до пятого дня, достигая значений, идентичных контрольной группе. Вероятно, это связано с гибелью β -клеток: у большинства особей с индуцированным окислительным стрессом наблюдались изменения в архитектуре поджелудочной железы, выражающиеся в уменьшении количества и размера наблюдаемых островков Лангерганса. Как у личинок, так и у взрослых особей после установления патологии были зарегистрированы повышенные уровни глюкозы, статистически достоверно отличающиеся от контрольных групп.

Выводы. Мы предполагаем, что индуцируемый в нашей хомогенетической модели окислительный стресс приводит к повреждению инсулин-секретирующих клеток и развитию патологии, схожей с диабетом первого типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 24-15-00559

Д4. Исследование биологической активности и механизма действия β -шпиличных танатин-подобных антимикробных пептидов у представителей подотряда *Heteroptera*

Ю.С. Тепловодская (juliya.teplovodskaya@gmail.com)^{1,2}, А.А. Смолина¹, П.В. Пантелеев^{1,2}, Т.В. Овчинникова^{1,2}

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

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

Введение. Танатин представляет собой антимикробный пептид (АМП) из шипастого клопа-солдатика (*Podisus maculiventris*), состоящий из 21 аминокислотного остатка и обладающий уникальной для антимикробных пептидов насекомых β -шпиличной структурой, стабилизированной одной дисульфидной связью. Механизм действия танатина заключается в связывании с периплазматическими липополисахарид-транспортирующими белками LptA и LptD, что приводит к нарушению целостности внешней мембраны клетки. В связи с этим, данный АМП проявляет высокую активность в отношении многих клинически значимых грамотрицательных бактерий.

Методы. В данной работе, путём гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* BL21 (DE3) нами была получена панель природных гомологов танатина из различных видов подотряда *Heteroptera* (клопы), после чего мы провели исследование спектра их антибактериальной активности. Для определения механизма действия нового пептида Rip-2 из соевого клопа *Riptortus pedestris*, который оказался в несколько раз активнее танатина, мы провели анализ геномной ДНК отобранных резистентных к данному АМП клонов *E. coli*. На следующем этапе, нами был получен флуоресцентно-меченный мономер белка LptA в виде гибридной конструкции LptA_m-sfGFP-His6, необходимый для исследования взаимодействия с ним Rip-2 методом микромасштабного терморефа (MST).

Результаты. Анализ резистентных клонов выявил потенциальные сайты связывания Rip-2 с белком-мишенью LptA. Выход очищенного рекомбинантного белка LptA_m-sfGFP-His6 составил 30 мг на литр бактериальной культуры. Был разработан универсальный протокол для оценки связывания танатин-подобных пептидов с белком LptA_m при помощи метода MST.

Выводы. Было показано связывание Rip-2 и контрольного пептида танатина с белком LptA из клеток *E. coli*. Полученная система может быть использована в перспективе для исследования связывания других танатин-подобных пептидов с белками LptA из различных грамотрицательных патогенов.

Секция: Биохимия



БХ1. Поиск молекулярных мишеней для азитромицина с целью коррекции нейровоспаления в период отмены алкоголизации в головном мозге крыс

М.А. Андреев (*makariy.andreev@gmail.com*)^{1,2}, С.А. Шамаева¹, С.О. Ереско¹, М.И. Айрапетов^{1,3}

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Россия, Санкт-Петербург

²Университет ИТМО, Россия, Санкт-Петербург

³Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Способность азитромицина (АЗМ) вносить изменения в механизмы нейровоспаления показана в ряде работ при моделировании патологических состояний. Наблюдаемые эффекты объясняются способностью АЗМ изменять поляризацию макрофагов в сторону противовоспалительного фенотипа, однако точная молекулярная мишень не установлена. Длительная алкоголизация вызывает развитие нейровоспаления. Цель работы заключалась в поиске молекулярных мишеней для АЗМ для коррекции нейровоспаления в период отмены длительной алкоголизации в головном мозге крыс.

Методы. Работа выполнена на самцах-крысах Вистар. Алкоголизировали путем внутрижелудочного введения 20%-го р-ра этанола (4 г/кг) в течение 1 мес. По окончании алкоголизации внутрижелудочно вводили АЗМ (3 раза; 40-160 мг/кг), группе контроля - воду. Мозг извлекали на 7-е сут. отмены. Выделение РНК, белков, синтез кДНК выполняли с помощью коммерческих наборов. ПЦР проводили в амплификаторе Mx3005P. Экспрессию генов интереса рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$, ген *Gapdh* был выбран как референсный. Измерение белка $\text{IL1}\beta$ выполняли с помощью коммерческого набора для проведения ИФА («Cloud-Clone Corp.», США). Оптическую плотность измеряли на фотометре Synergy 2. Для сравнения групп использовали критерии Манна-Уитни и Краскелла-Уоллиса. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Анализ молекулярных мишеней *in silico* выполнен в «Way2drug».

Результаты. Использование АЗМ снизило экспрессию генов *Il1b*, *Ccl2*, *Irf3*, *Tlr4* и *Hmgb1* в прилежащем ядре мозга. Повышение содержания экспрессии мРНК рассматривается как маркер нейровоспаления. На экспрессию гена *Nfkb1* АЗМ не оказал влияния. Введение АЗМ скорректировало повышенную экспрессию генов *Tlr3*, *Hmgb1* и *Il1b* в гиппокампе мозга крыс. АЗМ в дозировке 160 мг/кг снизил уровень белка $\text{IL1}\beta$ до контрольных значений. По результатам анализа *in silico* из найденных биомолекул отобраны три мишени - NTF3, IRAK3, PAK2, так как они имеют отношение к исследованным нами генам.

Выводы. Выполненное исследование позволило обнаружить молекулярные мишени, посредством которых АЗМ может оказать обнаруженный эффект снижения признаков нейровоспаления в головном мозге крыс.

ВХ2. Взаимодействие фактора транскрипции E2F1 с ацетилтрансферазами в нейронах головного мозга после ишемии

Е.А. Борисенко (evgeniabor11@gmail.com)¹, В.В. Гузенко¹

¹*Лаборатория «Молекулярная нейробиология», Южный Федеральный Университет, Россия, Ростов-на-Дону*

Введение. E2F1 — один из ключевых транскрипционных факторов, определяющий клеточную судьбу при ишемии мозга. Его активность, как мультифункционального белка, регулируется посттрансляционно. Особенно значимы модификации в неупорядоченных участках. Ацетилирование является одной из важнейших посттрансляционных модификаций для белков с неупорядоченной структурой. Однако исследований ацетилирования белков участвующих в гибели нейронов после ишемии недостаточно. В связи с этим, целью данной работы является идентификация вероятных ацетилтрансфераз, а также поиск сайтов ацетилирования фактора транскрипции E2F1 участвующих в апоптозе нейронов головного мозга после ишемии.

Методы. Определение неупорядоченных участков E2F1 выполнено с использованием базы данных DisProt и алгоритма AIUPred. Поиск предполагаемых сайтов ацетилирования E2F1 и ацетилтрансфераз осуществляли с помощью программы GPS-PAIL 2.0. Экспериментальную модель ишемии головного мозга проводили на взрослых крысах линии Wistar. Для исследований использовали перифокальную область очага ишемии. Анализ ко-иммунопреципитации и близкого лигирования (DuolinkPLA) E2F1 с ацетилтрансферазами выполняли через 24 часа после повреждения.

Результаты. С помощью программы GPS-PAIL 2.0 удалось идентифицировать ацетилтрансферазы PCAF и P300 как наиболее предполагаемые участники ацетилирования E2F1. А также определили, что данные ферменты ацетируют E2F1 преимущественно по лизинам 117, 120 и 125. Это соответствует расположению неупорядоченных участков в структуре E2F1. Данные анализа Duolink PLA и ко-иммунопреципитации указывают на то, что через 24 часа в нейронах перифокальной области ацетилирование E2F1 происходит преимущественно по лизинам 117 и 125 под действием ацетилтрансферазы PCAF, в меньшей степени с участием P300.

Выводы. Ацетилирование E2F1, в неструктурированных участках по лизинам 117 и 125 в нейронах после ишемии, осуществляется PCAF и, в меньшей степени, P300. Данные посттрансляционные модификации E2F1 могут играть ключевую роль в выживании и смерти нейронов после ишемии. Дальнейшее изучение процессов ацетилирования E2F1 имеет полезные перспективы в терапии ишемического инсульта.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 24-15-00268.

ВХЗ. Модельная система для локальной индукции окислительного стресса в клетках Купфера печени мыши

С.В. Васильченко (vasilchenkov@ty.msu.ru)¹, В.Д. Стародубова¹, А.Г. Шохина¹

¹*Лаборатория экспериментальной онкологии, НИИ Трансляционной медицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Россия, Москва*

Введение. Печень - ключевой участник обмена веществ, что обуславливает высокий уровень активных форм кислорода (АФК). Избыток АФК вызывает окислительный стресс (ОС). ОС наблюдается при патологиях печени, связь между ними неясна. Для разработки лечения нужно изучить связь, создать инструменты для моделирования ОС в печени. DAAO катализирует дезаминирование D-аминокислот с образованием H₂O₂. Детекция H₂O₂ возможна сенсорами HyPer, при окислении H₂O₂ изменяют свои спектральные характеристики. К непаренхимным клеткам печени относят клетки Купфера (КК). КК активируются в т.ч. АФК. КК вовлечены в большинство патологии печени. Для изучения влияния ОС в КК на печень нужна модельная система.

Методы.

Получили конструкции кДНК DAAO-HyPer7 под контролем про-моторов, специфичных для КК: VSIG4, ADGRE1 на основе AAB. Проверили активность *in vitro* на HeLa Kyoto, HepG2, HEK293TN. После липофильной трансфекции индуцировали DAAO D-норвалином, проверяли максимальный ответ HyPer7 добавлением H₂O₂. Локализацию HyPer7-DAAO *in vivo* оценивали после инъекции в печень мыши AAB с конструкциями. Через 18 дней - аутопсия. На криотоме получали срезы, далее проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с антителами к DAAO.

Результаты. Полученная система на основе DAAO позволяет генерировать H₂O₂-ассоциированный ОС в отдельных клетках модельных организмов. HyPer7 способствует визуализации динамики H₂O₂. Созданы конструкции с HyPer7-DAAO под контролем ADGRE1, VSIG4. *In vitro* подтверждена активность HyPer7 и DAAO под контролем ADGRE1 в HeLa Kyoto. При VSIG4 трансген HyPer7-DAAO не синтезируется в HeLa Kyoto, HEK293TN, HepG2. *In vivo* ADGRE1 обеспечил высокую концентрацию HyPer7-DAAO в зонах, совпадающих с расположением КК, в отличие от VSIG4, показавшего неспецифичную экспрессию. Результаты работы предоставляют инструменты для генерации ОС в КК печени мыши, что поможет изучить связь ОС и патологий.

Выводы. 1. Созданы конструкции с кДНК HyPer7-DAAO под контролем VSIG4 и ADGRE1, специфичных для КК. 2. HyPer7-DAAO функционально активна *in vitro* в клетках HeLa Kyoto под ADGRE1, не экспрессируется под VSIG4 в HeLa Kyoto, HEK293TN, HepG2. 3. Инъекция в печень AAB с HyPer7-DAAO под ADGRE1 приводит к трансдукции клеток вокруг сосудов, вероятно - макрофагов. VSIG4 обеспечивает неспецифичную локализацию HyPer7-DAAO.

БХ4. Структурно-функциональная характеристика уникального β -каротин-связывающего белка, определяющего желтую окраску саранчи

Е.Е. Доминник (dominnikjr@gmail.com)^{1,2}, Н.А. Егоркин^{2,3}

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

²ФИЦ биотехнологии РАН, Россия, Москва

³Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Пустынная саранча *Schistocerca gregaria* – распространенный вредитель, приносящий экономические убытки уничтожением сельхозугодий. В период массовых миграций окраска самцов пустынной саранчи меняется на ярко-желтую, обусловленную накоплением в покровах β -каротина в виде водорастворимого комплекса с β -каротин-связывающим белком (ВВР), однако подробно физико-химические свойства ВВР охарактеризованы не были. Целью данной работы являлось охарактеризовать свойства и структуру ВВР.

Методы. Нативный ВВР выделен из покровов половозрелого самца пустынной саранчи, рекомбинантный ВВР получен экспрессией в различных каротиноид-продуцирующих штаммах *E.coli*. Высокоочищенный ВВР получен методами вычитающей Ni^{2+} -аффинной и эксклюзионной хроматографии. Комплексы ВВР с каротиноидами охарактеризовали методами аналитической гель-фильтрационной хроматографии с полноспектральной детекцией, рамановской и КД спектроскопией. Каротиноиды анализировали методом ВЭЖХ. Белок кристаллизовали методом “висячей капли”, данные РСА получали на источнике синхротронного излучения (Китай).

Результаты. Рекомбинантный ВВР аналогичен по свойствам нативному белку. При экспрессии в клетках *E.coli*, продуцирующих ксантофиллы, ВВР предпочтительно связывает β -каротин, в меньшей степени эхиненон и незначительно – кантаксантин и зеаксантин. Комплекс ВВР с β -каротином хорошо растворим в воде и стабилен к воздействию денатурирующих агентов. β -каротин в комплексе с ВВР демонстрирует гипсохромный сдвиг и тонкую структуру спектра поглощения по сравнению со спектром β -каротина в органических растворителях, что свидетельствует о гидрофобности окружения и деформации каротиноида. Для определения механизма связывания и объяснения свойств была решена кристаллическая структура. ВВР обладает TULIP-укладкой, образующей гидрофобный туннель, в котором размещается β -каротин. ВВР также способен обратимо связываться с хитином, что объясняет его накопление в кутикуле.

Выводы. Получена структура, объясняющая механизм связывания β -каротина с ВВР, а также продемонстрированы свойства, перспективные для применения ВВР в биотехнологии.

БХ5. Нарушения глюкокортикоидной системы потомства пренатально гипоксированных самок крыс сопровождается тревожно-депрессивным поведением

И.Э. Исаков (isuratavo@gmail.com)¹, С.С. Потапова², О.В. Ветровой²

¹Биологический факультет СПбГУ, Россия, Санкт-Петербург ²Институт Физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Наши предыдущие исследования показали, что у пренатально гипоксированных крыс происходят выраженные нарушения суточной динамики глюкокортикоидов по сравнению с контролем. Мы предположили, что данные изменения у самок во время беременности могут привести к нарушениям развития их потомства.

Методы. Работа выполнена на крысах линии Вистар. Беременных самок на 14-16 дни беременности подвергали острой гипоксии (3 сеанса по 3 ч при 180 мм.рт.ст.). К контрольным и пренатально гипоксированным самкам в возрасте 3 месяцев подсаживали интактных самцов. Дальнейшее исследование проводили на самцах, потомках пренатально гипоксированных крыс (ППГ). С помощью поведенческих тестов оценивали исследовательскую и двигательную активность (открытое поле), тревожное (приподнятый крестообразный лабиринт) и депрессивное (тест Порсолта) поведение. Экспрессию глюкокортикоидных рецепторов (ГР), кортиколиберина, а также проопиомеланокортина (ПОМК) и адренокортикотропного гормона (АКТГ) измеряли методами вестерн-блоттинга и полимеразной цепной реакции. Концентрацию кортикостерона измеряли с помощью конкурентного иммуноферментного анализа.

Результаты. Мы не выявили изменений в относительном содержании мРНК и белка кортиколиберина в гипоталамусе и мРНК *protc* в гипофизе, однако количество белка ПОМК и АКТГ в гипофизе было существенно увеличено. Нами показано увеличение концентрации кортикостерона в плазме крови и гиппокампе (при этом в других структурах мозга изменений не обнаружено). В гиппокампе ППГ крыс не выявлено изменений относительного содержания мРНК *nr3 c1*, но обнаружено снижение содержания белка ГР. Описанные изменения сопровождаются изменениями поведения: для ППГ крыс характерно депрессивное поведение, тревожность, а также снижение исследовательской и двигательной активности.

Выводы. Таким образом, пренатальная гипоксия даже во втором поколении может вызывать нарушения функционирования глюкокортикоидной нейроэндокринной системы, сопровождающиеся тревожно-депрессивным поведением и когнитивным дефицитом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2020-921 от 13.11.2020).

БХ6. Исследование влияния аминокислотных замен Т31М, R45K и R192Н на иммунохимические свойства рекомбинантной сердечной изоформы тропонина I человека

Я.А. Климова (yaroslava.klimova@yandex.ru)¹, Э.И. Киреева¹, В.С. Перельгина¹, И.А. Прохоров¹

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

Введение. Тропонин I вместе с тропонинами T и C образует тропониновый комплекс (ИТС-комплекс), который является важным регулятором сокращения сердечной и скелетной мускулатуры. В сердце тропонин I и тропонин T представлены в виде специфических изоформ (сTnI и сTnT). При повреждении кардиомиоцитов сердечные тропонины высвобождаются в кровоток, их детекция иммунохимическими методами является распространенным способом диагностики заболеваний миокарда. Для сTnI человека описан ряд мутаций, приводящих к аминокислотным заменам в белке. Их наличие может повлиять на точность иммунохимического определения сTnI в образце и, как следствие, на достоверность результатов анализа. В данной работе изучали влияние замен Т31М, R45K и R192Н на связывание моноклональных антител, специфичных к сTnI.

Методы. Методом ПЦР-мутагенеза получали кодирующие последовательности сTnI человека с заменами Т31М, R45K или R192Н. Белок экспрессировали в бактериальной системе *E. coli* штамма Rosetta и очищали с помощью аффинной хроматографии на носителе со смесью иммобилизованных моноклональных антител, специфичных к сTnI. Для проведения иммунохимического анализа получали ИТС-комплексы, содержащие мутантные сTnI и рекомбинантные сTnT и тропонин C, после чего проводили гель-хроматографическое разделение белков. Сравнение иммунохимических свойств ИТС-комплексов, содержащих мутантные формы сTnI с заменами Т31М, R45K или R192Н, со свойствами ИТС-комплекса дикого типа проводили методом иммуноферментного анализа «сэндвич»-типа с использованием моноклональных антител, специфичных к эпитопам, содержащим аминокислотные замены.

Результаты. Замена Т31М ухудшала связывание антител 820, R23 и Y303 с сTnI, но не оказывала значительного влияния на связывание с ним антител R1, R33, R85, M155 и Y306. Мутация R45K привела к снижению иммунохимической активности сTnI в паре 560-19C7-HRP, но не оказывала влияния на связывание 19C7 в паре 19C7-560-HRP. Данная аминокислотная замена не оказала существенного влияния на связывание антитела Y309 с целевым белком. При использовании пар 19C7-MF4-HRP, 16A11-MF4-HRP и 456-TnT406-HRP наблюдали снижение иммунохимической активности сTnI с заменой R192Н по сравнению с белком дикого типа. Для пар MF4-16A11-HRP и 460-TnT406-HRP такого эффекта не наблюдалось.

Выводы. Исследуемые мутации влияют на связывание некоторых антител с сTnI, но не оказывают значительного влияния на связывание с ним других.

БХ7. Влияние тяжелой гипоксии на HIF1-зависимый метаболизм глюкозы в развивающемся и взрослом мозге крыс

Л.И. Клыс (st069065@student.spbu.ru)¹, С. Потапова^{1,2}, Д.Н. Сафарова^{1,2}, О.В. Ветровой^{1,2}

¹*Биологический факультет СПбГУ, Россия, Санкт-Петербург*

²*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Россия, Санкт-Петербург*

Введение. Будучи крайне опасными для функционирования взрослого мозга, последствия гипоксии на развивающийся мозг могут быть не менее серьезными. Ключевую роль в адаптации клетки к нехватке кислорода отводят транскрипционному фактору, индуцируемому гипоксией 1 (HIF1), влияющему на экспрессию генов гликолиза и пентозофосфатного пути (ПФП). ПФП играет роль основного источника НАДФН, который поддерживает редокс-статус и необходим для работы антиоксидантной системы. Целью работы было изучить влияние тяжелой гипоксии на HIF1-зависимый метаболизм глюкозы в развивающемся и взрослом мозге крыс.

Методы. Работа проводилась на крысах линии Wistar разных возрастных групп. Для создания гипоксических условий была использована модель тяжелой гипобарической гипоксии (ТГ): барокамера проточного типа, 160-180 мм рт. ст., время воздействия 3 часа, 5% O₂ в однократном и трехкратном режимах. Содержание белков оценивали с помощью метода вестерн-блот. Для измерения активности ферментов, концентрации метаболитов и редокс-статуса клетки использовались спектрофотометрические методы.

Результаты. Наши данные показали, что для взрослого и развивающегося мозга характерно увеличение содержания субъединицы HIF1 α в нейронах CA1 области гиппокампа после ТГ, что коррелирует со снижением интенсивности работы ПФП, в частности уменьшением активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, и сдвигом метаболизма глюкозы в сторону анаэробного гликолиза, что выражалось в повышенной активности лактатдегидрогеназы и накоплении лактата. Все это ведет к развитию окислительного стресса, о чем свидетельствует сниженное количество НАДФН и смещение редокс-статуса клеток в сторону закисления. Показано, что у крыс, перенесших пренатальную гипоксию, при воздействии ТГ рассматриваемые показатели находятся на уровне, сходном с острой реакцией взрослых контрольных животных на ТГ. Однако крысы, подвергшиеся пренатальной гипоксии, в зрелом возрасте оказались менее чувствительны к ТГ, на что указывает менее выраженные изменения метаболизма глюкозы в процессе постгипоксической реоксигенации по сравнению с контролем.

Выводы. Таким образом, тяжелая гипоксия в нейронах гиппокампа вызывает нарушение баланса между ПФП и анаэробным гликолизом в пользу последнего, что ведет к развитию окислительного стресса.

БХ8. Разработка модели для исследования RAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 при фибротических изменениях в первичной культуре кардиофибробластов неонатальных крыс

К.В. Ковалева (xenia.v.kovaleva@mail.ru)¹, Д.В. Серебряная¹

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

Введение. Одна из самых распространенных сердечных патологий - сердечная недостаточность (СН), которой часто сопутствуют фибротические изменения миокарда. Протеолитические фрагменты связывающего IGF белка IGFBP-4, образующиеся в результате специфического протеолиза под действием протеазы RAPP-A, являются прогностическими маркерами СН. В ходе протеолиза происходит высвобождение IGF, который, связываясь со своим рецептором, повышает жизнеспособность клеток сердца. Однако еще неизвестно, связано ли сопутствующее СН усиление RAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 с фибротическими изменениями в миокарде. Поэтому цель нашей работы: разработка модели развития фиброза под действием профибротического агента TGF- β в первичной культуре кардиофибробластов неонатальных крыс для исследования динамики протеолиза IGFBP-4 при данном патологическом состоянии.

Методы. Из неонатальных крыс получили первичную смешанную культуру кардиофибробластов и с помощью антител к α -SMA и тропонину I провели ее иммуноцитохимическую характеристику. Фибротические изменения моделировали под действием 15 и 30 нг/мл TGF- β в течение 90 часов. Концентрацию NT-фрагментов IGFBP-4 после его протеолиза измеряли методом иммунофлуоресцентного анализа.

Результаты. Содержание кардиофибробластов в полученной культуре составило 90% + 2%. Эффективность моделирования фибротических изменений оценили по: 1) отсутствию негативного влияния TGF- β на жизнеспособность клеток, 2) увеличению содержания, площади и интенсивности флуоресценции α -SMA, 3) усилению пролиферативной и миграционной активности кардиофибробластов в 3 раза при увеличении концентрации TGF- β . Под действием 15 нг/мл TGF- β в течение 90 часов продемонстрировали, что уровень RAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 возрастает в 1,5 раз в первые 3 часа от начала протеолитической реакции.

Выводы. При развитии фибротических изменений в кардиофибробластах происходит усиление RAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4. Оно может являться компенсаторным механизмом, способствующим высвобождению IGF на ранних этапах фибротических изменений, чтобы реализовать кардиопротекторные функции IGF и препятствовать развитию патологии.

БХ9. Изучение противоопухолевой активности новых производных гидроксамовых кислот в комбинации с доксорубицином на опухолевых клетках разного происхождения

К.А. Колесова (caryinne@list.ru)^{1,2}, В.А. Мумятова¹, Б.А. Третьяков¹

¹ *Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии, Россия, Черноголовка*

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

Введение. Большинство противоопухолевых препаратов, применяемых в классической химиотерапии, являются высокотоксичными соединениями, использование которых сопровождается развитием побочных эффектов. К таким препаратам относится и доксорубин, применение которого ограничено дозозависимой кардиотоксичностью. Одним из подходов, позволяющих снизить дозы доксорубина и уменьшить побочные эффекты, является комбинированная химиотерапия, в частности, в сочетании с ингибиторами гистондеацетилаз (HDAC), к которым относятся гидроксамовые кислоты. Использование соединений этого класса может привести к усилению чувствительности опухолевых клеток к действию противоопухолевых агентов.

Методы. Исследования проводили на клеточных линиях HeLa и HepG2. Оценку HDAC-ингибирующей активности соединений проводили с помощью наборов Fluorogenic HDAC (1, 3, 6, 8) assay kit (BPS Bioscience, USA), а также по способности ингибировать деацетилирование гистона H3 методом электрофореза и иммуноблоттинга. Цитотоксичность соединений и их комбинаций с доксорубицином исследовали с помощью МТТ-теста. Исследование влияния соединений на содержания доксорубина в клеточных ядрах оценивали по интенсивности флуоресценции доксорубина в ядерных экстрактах.

Результаты. Обнаружено, что исследуемые соединения в монорежиме не проявляют цитотоксических свойств в отношении обеих клеточных линий. При этом соединения проявляют HDAC-ингибирующие свойства *in vitro*, наиболее выраженный эффект наблюдается в отношении HDAC3. В концентрации 250 мкМ оба соединения вызывают накопление ацетилированного гистона H3 только в клетках линии HeLa. Предварительная обработка клеток HeLa исследуемыми соединениями за 24 часа до введения доксорубина приводит к усилению цитотоксического действия последнего на 10-30%. При этом оба соединения вызывают увеличение количества накопленного доксорубина в ядрах клеток HeLa. На клетках HepG2 таких эффектов не обнаружено.

Выводы. Таким образом, исследуемые новые производные N-гидроксипутанамида проявляют HDAC-ингибирующую активность, усиливают цитотоксическое действие доксорубина специфично для клеток линии HeLa благодаря увеличению количества накопленного доксорубина в ядрах клеток.

Работа выполнена в рамках Госзадания 124020500019-2

BX10. Изучение антирестрикционной системы DargA бактериофага P1

В.А. Колотова (vera_kolotova@list.ru)¹, М.А. Скутель², А.Б. Исаев²

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

²*Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколковский институт науки и технологии, Россия, Москва*

Введение. Бактериофаги и прокариоты сосуществуют вместе, что привело к появлению у микроорганизмов разнообразных по строению, сложности и функциям механизмов противовирусной защиты. В ответ фаги развили множество способов обходить действие этих систем. Например, известный умеренный бактериофаг P1 содержит в своем геноме два кластера генов *darg* (defence against restriction), продукты которых подавляют системы рестрикции-модификации (PM) I типа. Эти белки Darg упаковываются в капсид фага и защищают ДНК, проникающую внутрь клетки при инфекции (т. е. действуют *in cis*). Однако механизм ингибирования рестрикции до сих пор остается не изученным.

Методы. Для создания плазмидных конструкций применялись методы клонирования Gibson Assembly (NEB) и Q5 Site-Directed Mutagenesis (NEB) с последующей трансформацией и работой в клетках *E. coli* K-12 BW25113, содержащих плазмиду, кодирующую защитную систему BREX (*E. coli* HS). Для определения количества фагов в среде и исследования влияния экспрессии анти-имунного белка на фаговую инфекцию применялся классический тест ЕОР (эффективность бляшкообразования).

Результаты. Мы обнаружили, что P1 также способен заражать бактерий, несущих защитную систему BREX, и показали, что именно система Darg способствует ингибированию BREX, при этом анти-BREX эффект также наблюдался *in trans*. Нам удалось установить, что белок DargA обладает сложной предсказанной третичной структурой и состоит из нескольких пространственно изолированных модулей, предположительно ответственных за разные функции. Нам удалось выяснить, что именно С-терминальный домен ответственен за ингибирование защитной системы. Чтобы определить роль других доменов, нами был получен вариант P1 с отсутствием геномной версии гена *dargA*.

Выводы. Мы впервые показываем, что анти-рестрикционная система Darg бактериофага P1 способна ингибировать защитную систему BREX. Для этого достаточно экспрессии с плазмиды (*in trans*) лишь одного белка DargA. Анализ трёхмерной пространственной структуры белка показал наличие трёх пространственно-изолированных доменов, один из которых ответственен за ингибирование, а два других, предположительно вовлечены в загрузку белка в капсид и олигомеризацию. Понимание устройства Darg системы вносит важный вклад в изучение работы систем PM I типа и BREX.

ВХ11. Иммуно-RCA на микрочипе для высокочувствительной детекции антигликановых антител

Е.Э. Корнилова (katya.kornila@bk.ru)¹, Д.Ю. Рязанцев¹

¹*Лаборатория молекулярной диагностики, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва*

Введение. Количественное определение иммуноглобулинов и антител к гликанам в биоматериалах и тканях человека является важным инструментом ранней диагностики и мониторинга онкозаболеваний. Одним из высокочувствительных методов обнаружения антител в низких концентрациях является метод амплификации катящимся кольцом (RCA), в его иммунологическом варианте (иммуно-RCA), сочетающем специфичность взаимодействия антиген-антитело с возможностями амплификации нуклеиновых кислот. Метод эффективен для выявления IgG, IgA и IgM, а также для профилирования антител к гликанам. В работе изучается потенциал иммуно-RCA для высокочувствительного выявления антител к антигенам групп крови ABO на микрочипе.

Методы. ДНК-полимеразу фага phi29 получали гетерологичной экспрессией в *E. Coli* с последующей очисткой металл-афинной, гидрофобной и эксклюзионной хроматографиями. Микрочипы с гликанами A и B типа печатали на активированные слайды с помощью SciFlexArrayer S5. В качестве контрольных точек использовали меченый Cy3-BSA и стрептавидин. Для детекции античеловеческих антител применяли биотинилированные антитела IgG, IgM и IgA человека, а также меченый AlexaFluor555 и немеченный стрептавидин. Кольцевые матрицы для RCA получали лигированием одноцепочечных олигонуклеотидов. Стандартный иммуноанализ включал выявление антител через биотинилированные вторичные антитела и AlexaFluor555 меченный стрептавидин. Реакцию RCA проводили при комнатной температуре (1 ч - ON), а детекцию выполняли аналогично стандартному иммуноанализу.

Результаты. Получено ~10 мг чистой phi29 ДНК-полимеразы с концентрацией 0,3 мг/мл. Наибольшая скорость амплификации достигается с кольцевой матрицей длиной 58 нуклеотидов. Иммуно-RCA продемонстрировал высокую чувствительность по сравнению с традиционным методом: при 1-часовой реакции антитела детектировались уже при разведении сыворотки 1/640 (против 1/320 в стандартном анализе), а при ночной инкубации – до 1/5120. Чувствительность метода достигла ~1 нг/мл.

Выводы. Разработана технология детекции анти-гликановых антител методом иммуно-RCA с использованием гликанового микрочипа, повышена чувствительность более чем в 10 раз (с 1/320 до 1/5120 разведений сыворотки). Однако метод требует инкубаций в течении трех дней. В дальнейшем мы оценим эффективность метода для выявления антиген-специфических антител и онкомаркеров.

БХ12. Уточнение строения активного центра гиспидин-3-гидроксилазы методом направленного мутагенеза

ДА Кузнецова (kuznetcovada@ty.msu.ru)^{1,2}, ТВ Чепурных¹, АЮ Гороховатский¹

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

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Гиспидин-3-гидроксилаза (НЗН) катализирует реакцию синтеза грибного люциферина. Она принадлежит классу А флавинзависимых монооксигеназ. Эти ферменты осуществляют присоединение молекулярного кислорода к ароматическому субстрату с образованием гидроксильной группы, используя NAD(P)H в качестве восстановителя. Кофактором данной реакции является FAD, нековалентно связанный с белком. Установление механизма катализа и детального строения активного центра позволит направленно проводить модификации НЗН для увеличения ее активности и субстратной специфичности.

Методы. НЗН из *Armillaria ostoyae* (аоНЗН) экспрессировали в клетках *P. pastoris* и получали высокоочищенный препарат, который использовали для кристаллизации и разрешения структуры. Генно-инженерные конструкции аоНЗН с аминокислотными заменами получали методом ПЦР-мутагенеза с последующим модульным клонированием, экспрессировали в *P. pastoris* и далее получали частично очищенные препараты для измерения биохимических констант в сопряженной системе с грибной люциферазой.

Результаты. В результате очистки был получен препарат холоформы НЗН из *Armillaria ostoyae* со степенью чистоты более 95%, для которого впервые установлена структура с разрешением 3,8 Å. Положение активного центра определяли с помощью основанного на гомологии докинга лиганда. Далее был получен набор девяти мутантов с заменой одного из аминокислотных остатков в предполагаемом активном центре на аланин, для которых были измерены K_M и k_{cat} .

Выводы. Было установлено, что замена двух аминокислотных остатков на аланин значительно повышает K_M , таким образом они являются ключевыми для узнавания и связывания субстрата. Кроме того, для большинства полученных мутантов k_{cat} ниже чем для WT, однако были выявлены положения, в которых замена на аланин приводит к драматическому снижению k_{cat} . Таким образом, подтверждается определенное *in silico* положение активного центра.

БХ13. Влияние полноразмерного Hsp70 и его фрагментов на выживание и гибель клеток на различных моделях повреждения нервной системы

А.Е. Кунитына (nastasya.kunitsyna@gmail.com)¹, В.В. Гузенко¹, Ю.Н. Ка-люжная¹

¹*Лаборатория «Молекулярная нейробиология», Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванковского ЮФУ, Россия, Ростов-на-Дону*

Введение. Белок теплового шока 70 (Hsp70), в большей мере отвечающий за контроль состояния внутриклеточных белков, также принимает участие в работе множества сигнальных путей внутри клетки. Уже неоднократно было показано, что повышение уровня эндогенного Hsp70 оказывало положительный эффект на различных моделях нейротравмы, снижая гибель клеток и активируя их защитный потенциал. В связи с этим в данной работе нами был исследован нейропротекторный эффект препаратов экзогенного Hsp70 и его N- и C-концевых фрагментов на моделях ишемического инсульта у мышей и окислительного стресса в дифференцированных клетках нейробластомы SH-SY5Y.

Методы. При выполнении работы были использованы следующие методы: моделирование фототромботического инсульта (ФТИ) в коре головного мозга мышей и фотодинамическая обработка клеточных культур, иммунофлуоресцентная микроскопия.

Результаты. Уровень апоптоза клеток в коре головного мозга мышей значительно увеличивался на 3 и 7 сутки после ФТИ. Введение препаратов полноразмерного Hsp70 практически вдвое снижало число погибших клеток. N- и C-концевые фрагменты белка также показали нейропротекторный эффект, но на различных сроках после ФТИ.

Облучение SH-SY5Y с фотосенсибилизатором приводило к появлению большого количества некротических ядер, которое сокращалось после введения как полноразмерного Hsp70, так и его фрагментов. На данной модели C-концевой фрагмент имел наиболее сильное влияние на гибель клеток.

Анализ распределения меченых фрагментов белка доказал факт их проникновения в клетки и ядра SH-SY5Y в течение 30 минут после введения. Однако еще предстоит выяснить, соответствовало ли наблюдаемое свечение самим фрагментам Hsp70 или продуктам их расщепления.

Выводы. Таким образом, нами был доказан нейропротекторный эффект полноразмерного Hsp70 и его фрагментов на разных моделях повреждения клеток. Полученные данные говорят о перспективности дальнейшего исследования препаратов Hsp70 в контексте терапии патологий нервной системы.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0018.

БХ14.Изучение влияния полифункционального селенсодержащего антиоксиданта на показатели изолированного сердца при моделировании окислительного стресса

А.Ю. Кухарская (anastasiakukh2002@gmail.com)¹, Р.А. Князев²

¹*Институт естественных и социально-экономических наук НГПУ, Россия, Новосибирск*

²*Лаборатория медицинской биотехнологии НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, Россия, Новосибирск*

Введение. Восстановление перекиси водорода и пероксидов осуществляется с помощью семейства ферментов глутатионпероксидаз, поддержание адекватного уровня которых выступает как протектор при избыточности продуктов перекисного окисления липидов. Синтез и изучение селенсодержащих соединений, обладающих глутатионпероксидазной активностью, представляет интерес для использования в профилактике заболеваний сердца. Целью работы является исследование кардиотропных свойств селенсодержащего полифункционального антиоксиданта «АО-Se» (2-((додецилселанил)метил)-4,7-диметил-2,3-дигидробензофуран-5-ол) на функционирование изолированного сердца крысы в условиях профилактики окислительного стресса.

Методы. Крысы-самцы Wistar массой 300-350г. были поделены на три группы: «Контроль» (n=3), «70μ H₂O₂» (n=3) и «АО-Se» (n=4). Концентрация «АО-Se» – 10 мкг/л, в качестве перфузата использовался модифицированный буфер Кребса-Хензеляйта. Объёмную скорость коронарного потока определяли по объёму оттекающей от сердца жидкости (мл/мин). Регистрировали частоту сердечных сокращений сокращения (ЧСС) и давление в левом же-лудочке (ДЛЖ) при помощи DiSco 2 и программы DiSco ver. 3.46.1.1 (ООО «Мотор-Мастер», Россия). Работоспособность (Р) определяли как произведение прироста давления на частоту сокращений в минуту. Показателем эффективности работы было отношение выполненной работы к величине коронарного потока (Р/КП).

Результаты. При профилактике антиоксидантом в течение 10 минут КП был сопоставим контрольной группе, при моделировании окислительного стресса (замена перфузата на раствор с перекисью) значение КП увеличивалось. Значения ЧСС снижались после перфузии антиоксидантом. В условиях профилактики значения ДЛЖ, Р, Р/КП не изменялись и далее при замене перфузата наблюдали увеличение этих показателей до конца перфузии относительно групп «Контроль» и «Перекись».

Выводы. Антиоксидант «АО-Se» (2-((додецилселанил)метил)-4,7-диметил-2,3-дигидробензофуран-5-ол) обладает кардиотропным действием при предварительной перфузии в концентрации 10 мкг/л, способствует улучшению показателей ДЛЖ, ЧСС, Р и Р/КП при моделировании окислительного стресса.

ВХ15. Влияние мутаций в гене TRPM1 на структуру и функции тропомиозина

К.К. Лапшина (lapshina.2003@gmail.com)^{1,2}, В.В. Нефёдова²

¹*МГУ им. М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики, Россия, Москва*

²*ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва*

Введение. Тропомиозин (Trpm) – это белок семейства coiled-coil, образующий полимерный тяж вдоль актинового филамента. Изоформа Trpm1.1 обеспечивает регуляцию сердечного сокращения. Структура Trpm формируется за счет регулярных аминокислотных повторов (гептад). В базе данных ClinVar для гена *TRPM1* описаны многие мутантные варианты, в том числе новые мутации E97Q и I92M, затрагивающие положения *f* и *a*, соответственно. Патогенность этих мутаций клинически не подтверждена. Замены в близлежащих остатках (V95A, A107T) обнаружены у пациентов с кардиомиопатией, а мутация I92T в том же положении, что и I92M, ассоциирована с болезнью, что подтверждает функциональную важность этого участка белка.

Методы. Рекомбинантные Trpm имели аланин-сериновую N-концевую модификацию (AS), которая имитирует N-концевое ацетилирование Trpm. F-актин был выделен из скелетных мышц кролика. В работе были использованы методы дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), спектроскопии кругового дихроизма (КД), вискозиметрии и светорассеяния.

Результаты. Стабильность молекул Trpm1.1 E97Q и I92M оценивали с помощью КД и ДСК. Для Trpm1.1 WT характерны три тепловых перехода с максимумами при 36, 43 и 51°C. Замена I92M приводила к смещению высокотемпературного калориметрического домена (участка белка, денатурирующего независимо от других) в сторону более низкой температуры (48,6°C). Для Trpm1.1 E97Q при анализе кривых обнаружен новый переход в районе 61,7°C, что указывает на изменение стабильности различных участков молекулы Trpm. Анализ устойчивости комплексов Trpm с F-актином, проведенный методом светорассеяния, показал, что мутации немного влияли на температуры диссоциации Trpm от F-актина: 43,9°C – для E97Q, 45,2°C – для I92M против 45,4°C для Trpm1.1 WT. Эти значения близки к температуре второго перехода на кривых ДСК. Trpm образует тяж на поверхности F-актина за счет концевых взаимодействий, силу которых оценивали по вязкости растворов. Мутации слабо влияли на избыточную вязкость образцов в сравнении с WT (0,40, 0,48 и 0,35 мПа·с для E97Q, I92M и WT, соответственно).

Выводы. Смещение 3-го калориметрического домена Trpm1.1 I92M в низкотемпературную область свидетельствует о дестабилизации структуры. Изменения, происходящие в этом домене, относятся к N-концевой части молекулы. Вероятно, мутация I92M может приводить к развитию кардиомиопатии.

Лапшина К.К. является стипендиатом Фонда «БАЗИС» (№ 24-2-1-12-1).

БХ16. Разработка метода для оценки влияния мутаций в обратной транскриптазе ВИЧ-1 на ее структурное взаимодействие с ингибиторами обратной транскрипции

А.Э. Махмедова (maxmedova@inbox.ru)^{1,2}, Н.И. Акберова¹, П.В. Казимиров²

¹*Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии КФУ, Россия, Казань*

²*«РЦПБ СПИД и ИЗ МЗ РТ», Россия, Казань*

Введение. Несмотря на значительные достижения антиретровирусной терапии (АРТ), число ВИЧ-инфицированных ежегодно растет примерно на 1 млн человек. Возникновение мутаций устойчивости к препаратам АРТ делает терапию неэффективной. Чтобы лечение было успешным, необходимо обнаружить эти мутации и установить их влияние на связывание препарата с биологической мишенью. Большинство препаратов АРТ - ингибиторы обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ-1. Изучение структурного взаимодействия ОТ с ингибиторами у пациентов с устойчивостью к препаратам позволит скорректировать лечение и подобрать более действенные препараты.

Методы. Вирусную нагрузку определили с помощью коммерческой тест-системы «РеалБест ВИЧ ПЦР» (АО «Вектор-Бест», РФ). Для определения лекарственной устойчивости использовали тест-системы ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v.2.0 (Abbott Molecular, США). Обработку электрофореграмм проводили с помощью ПО Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems, США) с дальнейшим выравниванием на референсную последовательность с помощью программы ViroSeq HIV-1 Genotyping Software v 3.0 (Celera Diagnostics, Applied Biosystems, США) на секвенаторе «Нанофор-05» (НПО «Синтол», РФ). Мутации установили с помощью базы данных Stanford HIVDB. В работе использовали структуру полимеразного домена ОТ без мутаций из 1C0T. Мутации в структуру вносили в USCF Chimera. Структуры ингибиторов были взяты в PubChem. Молекулярный докинг проводили на серверах SwissDock, CB-Dock2, Seamdock, используя алгоритм Autodock Vina.

Результаты. Генотипирование проб пациентов с устойчивостью к азидотимидину, тенофовиру, невирапину и эфавирензу выявило данные мутации в ОТ: E138K, V106I, A62V, M184I, K101E, Y181C, G190S, K65R, D67N. Молекулярный докинг проводили в гидрофобном кармане полимеразного домена ОТ. Мутации A62V, K65R, D67N, M184I приводили к уменьшению взаимодействия азидотимидина и тенофовира с ОТ, энергия сродства -6,7 ккал/моль и -6,9 ккал/моль, соответственно (без мутаций -8,9 ккал/моль и -7,3 ккал/моль). Невирапин и эфавиренз показали худшее взаимодействие со структурой ОТ с мутациями K101E, Y181C, G190S, энергия сродства составила -9,4 ккал/моль и -9,2 ккал/моль (без мутаций -9,9 ккал/моль для обоих препаратов).

Выводы. Возможно, снижение аффинности данных ингибиторов к гидрофобному карману ОТ с мутациями связано с устойчивостью к АРТ у пациентов с этими мутациями в ОТ.

БХ17. Получение токсина OsK2 из яда черного скорпиона в рекомбинантной системе экспрессии

П.Б. Мейлах (*polina.meylakh@gmail.com*)^{1,2}, В.А. Юнусова², А.И. Кузьменков², А.А. Василевский²

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

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

Введение. Потенциал-зависимые калиевые каналы (Kv) играют важную роль в регуляции мембранного потенциала клеток и являются мишенями природных токсинов, найденных в ядах различных животных. Одним из таких токсинов является OsK2 – пептид из яда черного скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*. OsK2, помимо высокой аффинности, демонстрирует уникальную специфичность по отношению к калиевому каналу Shaker плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. Из-за ограниченного содержания токсина в природном яде, дальнейшее изучение структурных и фармакологических особенностей этого пептида может быть проведено посредством получения его рекомбинантного аналога.

Методы. Искусственный ген OsK2 был синтезирован *de novo* из олигонуклеотидов методом ПЦР, рестрицирован и лигирован по специфическим сайтам в вектор pET-32b(+), несущий в своем составе также ген «белка-помощника» – тиоредоксина. Полученной конструкцией трансформировали экспрессионный штамм клеток *Escherichia coli* SHuffle. Очистку целевого продукта проводили методом металл-аффинной хроматографии. Гибридный белок расщепляли бромцианом, после чего OsK2 очищали методом ОФ-ВЭЖХ. Масс-спектрометрический анализ использовался для подтверждения чистоты полученного токсина.

Результаты. Ген, кодирующий OsK2, был получен *in silico* на основе его аминокислотной последовательности, синтезирован из олигонуклеотидов и амплифицирован методом ПЦР, а после проведения реакции «рестрикции-лигирования» был получен экспрессионный вектор, содержащий целевой ген. Нарботку целевого продукта проводили в бактериальной системе экспрессии. Выход рекомбинантного продукта составил 0,96 мг с литра бактериальной культуры. Масс-спектрометрия подтвердила, что расчетная молекулярная масса (2 892 Да) соответствует экспериментальной.

Выводы. В ходе работы был получен плазмидный вектор, кодирующий токсин OsK2. Данная плазида использовалась для трансформации штамма *E. coli* SHuffle с последующей экспрессией целевого пептида в составе гибридного белка. После расщепления и очистки рекомбинантного продукта был получен токсин с выходом около 1 мг на литр бактериальной культуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-74-10028.

БХ18. Подбор условий выделения и очистки предполагаемой хитиназы *Paralithodes camtschaticus*

Ю.А. Минина (mininajulia2002@gmail.com)¹, О.В. Белова², Е.А. Согорин², И.Ю. Позднякова-Филатова²

¹Естественно-научный институт ТулГУ, Россия, Тула

²ФИЦ ПНЦБИ РАН, Россия, Пущино

Введение. Хитиназы - это гидролазы, катализирующие деградацию хитина. В гепатопанкреасе камчатского краба была обнаружена хитинолитическая активность, однако к настоящему моменту нет данных о том, какой белок ее проявляет. Мы идентифицировали в транскриптомных данных контиг, содержащий информацию о белке молекулярной массой 46.6 кДа, имеющем сходство с хитиназами из базы данных UniProtKB/Swiss-Prot (лучшее совпадение (E-value 4e-105, покрытие 94%, идентичность 42.73%) - эндохитиназа бражника табачного, P36362). Целью текущей работы было получить препарат рекомбинантного белка в клетках кишечной палочки, пригодный для измерения ферментативной активности.

Методы. Оптимизацию кодонов проводили с помощью сервера GenScript. Ген клонировали в векторе pET-19mod с помощью T5 exonuclease-dependent assembly. Для экспрессии хитиназы использовали штаммы *E. coli* ArcticExpress (DE3) и SHuffle® T7, клетки культивировали при 10 и 15°C, соответственно, в присутствии 40мкМ ИПТГ. Выделение и очистку белка проводили в нативных условиях, используя сорбент Ni-NTA. Биомассу разрушали в буфере состава 100мМ калий-фосфатный буфер pH 6.0/6.5/7.0/8.0, 500мМ KCl и 20мМ имидазол, для элюирования повышали концентрацию имидазола до 250мМ, фракции диализовали против буфера состава 20мМ калий-фосфатный буфер, 300мМ KCl и 50% глицерин. Общую хитиназную активность определяли по количеству редуцирующих сахаров, образующихся в результате гидролиза хитина, используя динитросалициловую кислоту.

Результаты. Хитиназа находилась преимущественно в тельцах включения. В клетках Arctic Express (DE3) в растворимой форме было 4.6 мкг белка, однако при концентрировании в процессе диализа он агрегировал. В клетках SHuffle®, в растворимой форме было 7.4 мкг белка, после диализа получили 25 мкл препарата с концентрацией хитиназы 74 нг/мкл. При оценке влияния pH на растворимость хитиназы получили при pH 6.0: 200 мкл препарата с концентрацией 74 нг/мкл, pH 6.5: 100 мкл с концентрацией 35 нг/мкл, pH 7.0: 90 мкл с концентрацией 84 нг/мкл. Удельная хитиназная активность - 162 ед.акт./мг.

Выводы. Наибольшее количество растворимого белка удалось получить в клетках SHuffle® T7, используя калий-фосфатный буфер с pH 6.0: выход составил 14.5 мкг белка, концентрация препарата - 74 нг/мкл. Белок был способен гидролизовать коллоидный хитин, удельная хитиназная активность составила 162 ед.акт./мг.

БХ19. Выделение и очистка конститутивной 20S протеасомы. Изучение кинетики 20S протеасомы в присутствии природного активатора –спермина и его аналогов.

Р.А. Оганов (gorky1868@gmail.com)^{1,2}, Г.А. Саратов², А.А. Кудряева², А.А. Белогуров²

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

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

Введение. 20S протеасома – олигомерный протеолитический фермент (MW 700кДа). Модулирование активности протеасом является перспективной стратегией лечения различных заболеваний. Ингибирование протеасомы используется в терапии некоторых видов рака, тогда как ее активация является потенциальным методом борьбы с нейродегенеративными заболеваниями. В данной работе исследовано влияние природного активатора протеасомы полиамина — спермина.

Методы. Стабильные линии клеток НЕК293Т, экспрессирующие субъединицу протеасомы PSMB4 с меткой НТВН растили и лизировали. Лизаты центрифугировали, супернатант инкубировали со стрептавидин-агарозой. Далее протеасому срезали со смолы с помощью TEV-протеазы. Подготовленные препараты 20S протеасом с концентрацией 0,9 мг/мл наносили на сетки для крио-ЭМ. Для изучения активности к протеасоме (10 мкг/мл) добавляли спермин в концентрациях (0,001мМ-10мМ) и инкубировали 30 минут при 37°С. После этого в реакционную смесь добавляли пептидный субстрат Suc-LLVY-АМС до конечной концентрации 20 мкМ.

Результаты. Был получен высокоочищенный препарат 20S протеасомы, а также проведено исследование её концентрационно-зависимой активации спермином и его аналогами. Методами Лайнуивера-Бёрка и Диксона установлено, что спермин действует как неконкурентный активатор 20S протеасомы. Аналоги спермина продемонстрировали менее выраженную активацию по сравнению с самим спермином. На основе данных криоэлектронной микроскопии выдвинута гипотеза о взаимодействии двух внутренних водородов при азотах спермина, которые координируют гидроксильную группу тирозина, расположенного непосредственно перед расщепляемой пептидной связью таким образом участвуя в катализе

Выводы. Спермин является неконкурентным активатором конститутивной 20S протеасомы. Аналоги спермина демонстрируют меньшую эффективность в активации 20S протеасом по сравнению со спермином. Результаты крио-ЭМ позволяет предположить, что азотные водороды спермина участвуют в катализе.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 23-74-00053

БХ20. Идентификация белкового окружения убиквитин-лигазы RNF168 с использованием TurboID

Н.А. Пижонков (kolya.pizhonkov@yandex.ru)¹, А.А. Белогуров¹, Г.А. Саратов¹, А.А. Кудряева¹

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

Введение. E3 убиквитин-лигаза RNF168 играет ключевую роль в формировании белкового окружения, обеспечивающего репарацию ДНК. RNF168 убиквитинирует гистон H2A(X) в N-концевой области, что служит платформой для привлечения белков, участвующих в восстановлении структуры ДНК. Регуляция активности RNF168 в области двуцепочечных разрывов ДНК, а также её роль в рекрутировании факторов репарации к поврежденным участкам ДНК, являются объектом активных исследований.

Методы. Была сконструирована генетическая конструкция, кодирующая белок RNF168, слитный с биотин-лигазой TurboID. Эта конструкция использует АТФ и биотин для генерации биотин-5'-АМФ — реактивного промежуточного продукта, который ковалентно метит белковое окружение. Также была создана контрольная конструкция, кодирующая только биотин-лигазу TurboID. Клеточная культура НЕК293Т была трансфицирована полученными конструкциями. Через 24 часа после трансфекции в культуру клеток добавлялся биотин, а ещё через 24 часа клетки лизировали. Из полученного клеточного лизата были преципитированы биотинилированные белки с использованием стрептавидин-агарозы, после чего их анализировали методом тандемной масс-спектрометрии, совмещенной с ВЭЖХ.

Результаты. Анализ показал, что в белковом окружении RNF168 присутствуют факторы сплайсинга, протеинкиназы, протеинфосфатазы, белки, участвующие в поддержании целостности хроматина во время деления и репарации, а также белки цитоскелета.

Выводы. Были идентифицированы новые белки, которые могут непосредственно взаимодействовать с E3 убиквитин-лигазой RNF168. В настоящее время проводятся исследования, направленные на выяснение механизмов, с помощью которых взаимодействие этих потенциальных партнеров может регулировать активность RNF168 и, соответственно, процессы репарации ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 24-74-10107

БХ21. Каталитические особенности γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы кукурузы (*Zea mays L.*) и ее участие в адаптации растительной клетки к абиотическим стрессам

Е.В. Плотникова (*kate_plotnikova36@mail.ru*)¹, Г.Б. Анохина¹, А.Т. Енпринцев¹

¹Медико-биологический факультет ВГУ, Россия, Воронеж

Введение. Изучение биохимических адаптаций метаболизма сельскохозяйственных культур является перспективным направлением фундаментальной науки, которое имеет прикладной аспект – снижение потерь урожая от неблагоприятных абиотических стрессовых факторов. γ -гидроксibuтиратдегидрогеназа (ГБДГ) – это фермент, участвующий в детоксикации янтарного полуальдегида и образовании γ -оксимасляной кислоты (ГОМК) – молекулы, играющей важную роль в регуляции углеродно-азотного обмена. Целью работы являлось изучение физико-химических свойств ГБДГ и роли данного фермента в адаптации клеточного метаболизма к солевому стрессу и гипоксии.

Методы. Очистку фермента осуществляли в несколько этапов с использованием гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Активность ГБДГ определяли спектрофотометрически. Анализ полученных белковых препаратов проводили с использованием ПААГ электрофореза. Электрофореграммы окрашивались с помощью зеленого кумасси G-250 и тетразолиевым методом. Субклеточную локализацию фермента определяли методом изоплотностного центрифугирования. Расчёт значений констант Михаэлиса-Ментен осуществляли методом Лайнуивера-Берка. Оптимум pH изоформ ГБДГ определяется путем измерения активности ГБДГ в серии растворов с различными значениями pH. Влияние металлов на активность ГБДГ оценивали путем измерения активности фермента в присутствии различных концентраций каждого иона.

Результаты. Было выявлено, что ГБДГ локализована преимущественно в митохондриях и цитоплазме. Оптимальные значения pH полученных энзимов различаются: для ГБДГ1 составляет 9.0, для ГБДГ2 оптимум pH равен 7.0. Кинетика ферментативной реакции подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. CaCl₂ и KCl увеличивают активность ГБДГ1, в то время как MgCl₂ оказывает незначительное ингибирующее действие. Каталитическая активность ГБДГ2 возрастает в присутствии CaCl₂, KCl и MgCl₂. Анализ ГБДГ-активности в листьях кукурузы при гипоксии и засолении показал активацию данной ферментной системы.

Выводы. ГБДГ в листьях кукурузы представлена двумя изоформами, отличающимися субстратной специфичностью, оптимумом pH, молекулярной массой и субклеточной локализацией. Установлено, что ГБДГ участвует в адаптации клеточного метаболизма к действию солевого стресса и дефициту кислорода.

БХ22. Белки, взаимодействующие с нуклеиновыми кислотами, как потенциальные участники патогенеза болезни Паркинсона

Е.А. Попик (evaporik2@gmail.com)¹, А.В. Спасельникова¹, И.В. Копылова¹, О.С. Лебедева¹

¹ *Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю. М. Лопухина, Россия, Москва*

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием. Около 3% случаев БП обусловлены мутациями в гене, кодирующем богатую лейциновыми повторами киназу 2 (LRRK2). Наиболее частая мутация приводит к замене G2019S в LRRK2 и повышает киназную активность фермента. LRRK2 вовлечен во многие клеточные процессы, однако далеко не все его функции и мишени изучены.

Для поиска мишеней LRRK2 в нашей лаборатории с использованием технологии CRISPR/Cas9 ранее была создана изогенная клеточная модель БП на основе ИПСК человека, включающая линии с различными аллельными состояниями LRRK2 по мутации, приводящей к замене G2019S. На дифференцированных дофаминергических нейронах были проведены транскриптомный, протеомный и фосфопротеомный анализы, которые показали повышенную экспрессию генов белков, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами (в том числе PRKDC), а также увеличение фосфорилирования 12 белков, включая DDX51, DDX46, DHX29, LIG3, которые взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами. Нарушение процессов репарации ДНК является одним из патологических механизмов при БП, что делает белки, ассоциированные с нуклеиновыми кислотами, перспективными участниками патогенеза БП. Целью нашей работы был выбор для дальнейшего изучения среди найденных потенциальных LRRK2-мишеней таких белков, экспрессия которых была достаточно высока на разных стадиях нейрональной дифференцировки.

Методы. Для этого мы провели дифференцировку ИПСК изогенной системы в нейральные предшественники и далее в дофаминергические нейроны. При помощи иммуноцитохимического окрашивания мы подтвердили фенотип полученных дифференцированных клеток. Далее мы провели количественную ОТ-ПЦР для анализа экспрессии генов *DDX51*, *DDX46*, *DHX29*, *LIG3* и *PRKDC* на разных стадиях дифференцировки.

Результаты. Мы показали, что гены *DDX46*, *DHX29*, *LIG3* и *PRKDC* демонстрируют высокую экспрессию в ИПСК, в нейральных предшественниках и дофаминергических нейронах, что делает их удобными кандидатами для изучения роли LRRK2 в регуляции белков, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами.

Выводы. Таким образом, нами выбраны наиболее перспективные потенциальные мишени LRRK2, которые могут опосредовать патогенез БП.

ВХ23. Влияние варианта с.886С>Т гена Th на активность тирозингидроксилазы и содержание биогенных аминов в мозге мышей

И.А. Рахов (*i.rakhov@g.nsu.ru*)^{1,2}, И. Алсаллум^{1,2}, Д.В. Базовкина², А.В. Куликов²

¹Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. Тирозингидроксилаза (ТН) — ключевой фермент синтеза дофамина и норадреналина в мозге. Снижение её функции связано патогенезом различных расстройств, включая болезни Паркинсона и Альцгеймера. Среди распространённых линий мышей был обнаружен только один вариант с.886С>Т в гене Th, однако его влияние на активность фермента ТН не было изучено.

Целью работы было исследование влияния варианта с.886С>Т (p.R278N) гена Th мышей на активность ТН и метаболизм дофамина в среднем мозге, стриатуме и гипоталамусе.

Методы. Эксперименты проводили на самцах мышей линии C57BL/6 (аллель 886Т) и подвида *Mus musculus castaneus* (аллель 886С) и их гибридах. Получали интеркроссы F2 от скрещивания C57BL/6 и *M. m. castaneus*. Аллель 886С был перенесён из генома *M. m. castaneus* в геном линии C57BL/6, затем проводили пять бэккроссирований и получали интеркроссы BC6×BC6 трёх генотипов. Генотипирование проводили методом аллель-специфичной ПЦР в реальном времени. Функциональную активность ТН измеряли методом ВЭЖХ, определяя количество образованной L-ДОФА. Уровень дофамина и его метаболитов HVA, DOPAC измеряли у интеркроссов BC6×BC6 также методом ВЭЖХ.

Результаты. Уровень активности ТН был выше в среднем мозге ($p<0,001$) и стриатуме ($p<0,05$) мышей *M. m. castaneus* по сравнению с мышами C57BL/6. В стриатуме интеркроссов F2 генотипа ТТ активность ТН была ниже, чем у генотипов СС и ТС ($p<0,05$). Также мыши генотипа СС имели наибольший уровень активности ТН, мыши генотипа ТС — промежуточный, мыши генотипа ТТ — наименьший в среднем мозге интеркроссов в F2 ($p<0,001$) и гибридов BC6×BC6 ($p<0,001$). При этом содержание дофамина было выше в среднем мозге мышей генотипа СС в сравнении с мышами генотипов ТТ и ТС ($p<0,05$). Однако мыши BC6×BC6 трех генотипов не различались по активности ТН и уровню дофамина в стриатуме и гипоталамусе.

Выводы. Таким образом, аллель 886Т в гене Th снижает активность ТН и уровень ДА в среднем мозге. Полученные результаты могут быть использованы в моделях дефицита тирозингидроксилазы на животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 25-25-00326.

ВХ24. Роль остатка Т43 активного центра в функционировании трансаминазы D-аминокислот из *Desulfomonile tiedjei*

Ю.В. Рудина (truzzz5214@gmail.com)^{1,2}, А.К. Бакунова², Е.Ю. Безсуднова²

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

²Институт биохимии им. А.Н.Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, Москва

Введение. Трансаминазы D-аминокислот (DATA) – пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые ферменты. Они играют важную роль в метаболизме многих бактерий и растений, а также имеют потенциал для применения в синтетической химии для прямого (*R*)-стереоселективного аминирования органических со-единений. Нами получена и охарактеризована новая трансаминаза D-амино-кислот из *Desulfomonile tiedjei* DSM 6799 (Desti-TA), активная в реакциях с D-аминокислотами и с первичными ароматическими (*R*)-аминами. В представленной работе проанализирована роль остатка Т43 в активности и стабильности фермента.

Методы. Рекомбинантные формы белка получали экспрессией в клетках *E.coli* Rosetta (DE3) pLysS. Активность ферментов определяли в реакции трансаминирования между D-аланином или (*R*)-метилбензиламином и α -кетоглутаратом спектрофотометрическими методами. Константу диссоциации комплекса апофермент-кофактор анализировали с помощью флуоресцентной спектроскопии, основанной на снижении тирозиновой флуоресценции при связывании апофермента с PLP.

Результаты. Множественное структурное выравнивание охарактеризованных DATA, а также аннотированных гомологов Desti-TA, показало, что у большинства рассмотренных последовательностей на β X-тяже активного центра находится остаток Е/D, расположенный рядом с каталитическим остатком лизина и способный образовывать солевой мостик с остатком R, координирующим PLP. Замена остатка Т43 на β X-тяже на остаток Е (вариант Desti-TA Т43Е) привела к множественным изменениям в функционировании фермента. Так, рН оптимум активности в реакции трансаминирования сместился с рН 8,0 до 6,5, а температурный оптимум снизился с 50 °С до 40 °С. При этом замена Т43Е привела к снижению аффинности фермента к кофактору. Константа диссоциации комплекса апофермент-кофактор дикого типа Desti-TA составляет $0,4 \pm 0,1$ мкМ, а для варианта превышает 50 мкМ.

Выводы. Остаток Т43 на β X-тяже является ключевым для активности и термостабильности трансаминазы D-аминокислот из *Desulfomonile tiedjei*, а также важен для стабилизации кофактора в активном центре фермента. Полученные результаты углубляют наше понимание взаимосвязи структуры и функций DATA.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 23-74-30004

БХ25. Исследование механизма зеленой окраски певчего кузнечика (*Tettigonia cantans*)

А.М. Алексин (4k5715@gmail.com)^{1,2}, М.В. Бреговский¹, А.Д. Лаврова¹, М.О. Семочкина¹

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

²ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва

Введение. Один из механизмов окраски насекомых обусловлен накоплением в покровах пигментов таких как меланины, омохромы, билины и каротиноиды. Для накопления и транспорта каротиноидов, являющихся крайне гидрофобными соединениями, требуются высокоспецифичные каротиноид-связывающие белки (КСБ). Окраска, обусловленная КСБ, представляет особый интерес, так как подобные белки могут найти применение в биотехнологии и медицине. Цель настоящей работы - выявить и охарактеризовать новый механизм окраски насекомых, обусловленный КСБ.

Методы. В ходе работы на Звенигородской биостанции им. С.Н. Скадовского с использованием методов жидкостной экстракции и тонкослойной хроматографии (ТСХ) проведено масштабное скрининговое исследование насекомых, направленное на выявление в них каротиноидов. В качестве объекта исследования выбран певчий кузнечик *Tettigonia cantans*. Методом нативного электрофореза продемонстрировано наличие зеленого пигмент-белкового комплекса, который охарактеризован методом аналитической гель-фильтрационной хроматографии с полноспектральной детекцией. Пигменты, входящие в состав белка, определены посредством ТСХ и спектрофотометрии. Высокоочищенный препарат получен при использовании гель-фильтрационной и ионообменной хроматографии. Для определения кажущейся молекулярной массы и наличия гликозилирования белка использован SDS-электрофорез. Молекулярная масса субъединиц, а также частичная аминокислотная последовательность определены с помощью масс-спектрометрии MALDI.

Результаты. Из покровов певчего кузнечика выделен зеленый пигмент-белковый комплекс, содержащий лютеин и синий пигмент билиновой природы. Комплекс элюируется симметричным пиком и обладает кажущейся молекулярной массой 55 кДа. Комплекс состоит из трех полипептидных цепей с кажущейся молекулярной массой по SDS-электрофорезу 20, 10 и 8 кДа, одна из цепей подвергается N-гликозилированию. По результатам масс-спектрометрического анализа пептидов выявлено, что белок гомологичен вителогенинам и образуется в результате процессинга белка-предшественника.

Выводы. Окраска *T. cantans* обусловлена накоплением зеленого растворимого пигмент-белкового комплекса, являющегося продуктом процессинга вителогенина и содержащего билин и каротиноид.

БХ26. Изучение изменения экспрессия генов, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом при раке легкого.

А.А. Смирнова (smanna17022003@gmail.com)^{1,1}, И.Ю. Лялина^{2,2}, И.В. Пронина^{3,3}

¹ *Факультет естественных наук «Государственный университет просвещения», Россия, Москва*

² *ФГАОУ ВО «Государственный университет просвещения», Россия, Москва*

³ *ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Россия, Москва*

Введение. Среди злокачественных новообразований рак лёгкого занимает лидирующие позиции в мире как по своей встречаемости, так и по смертности. Мужчины болеют в 6 раз чаще, чем женщины. За последние 20 лет общая заболеваемость выросла более чем в 2 раза, при этом среди мужчин на 51%, а среди женщин на 75%. Эпителиально-мезенхимальный переход - это процесс приобретения эпителиальными клетками свойств мезенхимальных клеток, как морфологических, так и физиологических. Цель исследования – оценить изменение уровней экспрессии генов *SNAI1*, *SNAI2*, *CDH1*, *ZEB1*, *ZEB2* в эпителиально-мезенхимальном переходе в образцах тканей опухолей по сравнению с гистологически нормальными тканями легкого.

Методы. В работе использовались 45 пар образцов РНК, выделенных из опухолевых и нормальных тканей легкого. Перед началом работы была определена концентрация РНК методом спектрофотометрии на приборе NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Сохранность РНК оценили методом электрофореза в денатурирующем агарозном геле. Оценку уровня экспрессии исследуемых генов проводили методом обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени на приборе CFX 96 Bio-Rad. В качестве референсных генов использовали *B2M* и *ACTB*. Статистическую обработку результатов проводили методом ANOVA после оценки нормальности распределения в тесте Шапиро-Уилка при помощи программного обеспечения CFX Maestro 2.0 Bio-Rad.

Результаты. В работе проанализированы уровни экспрессии 6 генов связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом *BMI1*, *CDH1*, *SNAI1*, *SNAI2*, *ZEB1*, *ZEB2*. Экспрессия гена *E*-кадгерина *CDH1* достоверно возрастало в 3,15 раза в клетках опухоли по сравнению с нормой, данные по медиане $p \leq 0,05$. Экспрессия генов *ZEB1* и *ZEB2* достоверно снизилась в 2,22 и 2,72 раза соответственно данным по медиане $p \leq 0,05$. Для гена *BMI1* показало повышение экспрессии в 1,68 раза. Для гена *SNAI1* понижение экспрессии в 1,33 раза, а для гена *SNAI2* повышение экспрессии в 1,28 раза.

Выводы. По результатам нашей работы, можно сделать вывод, что полученные нами данные могут быть использованы для разработки методов прогноза метастазирования в клинической практики и возможно создание таргетной терапии направленной против метастазирования

ВХ27. Цинк-зависимые сигнальные пути при глаукоме: роль индуцируемого фактора роста нервов VGF

С.С. Тулуш (sanchai2003@mail.ru)^{1,2}, М.Л. Шишкин^{1,2}, И.В. Родионов^{3,4}, Е.Ю. Зерный¹

¹*НИИ ФХБ им. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

²*Институт цифрового биодизайна и моделирования живых систем ПМГМУ им. Сеченова, Россия, Москва*

³*Институт трансляционной медицины и биотехнологии ПМГМУ им. Сеченова, Россия, Москва*

⁴*Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. Глаукома – нейродегенеративное заболевание, характеризующееся гибелью ганглиозных клеток сетчатки. Нейротоксический эффект может быть опосредован за счет секреции мобильного цинка, оказывающего влияние на функционирование внеклеточных сигнальных путей, в том числе на протеолитическую активацию вовлеченных сигнальных факторов. Целью работы являлся поиск цинк-зависимых сигнальных факторов, ассоциированных с глаукомой, а также характеристика эффектов цинка на их протеолитический процессинг.

Методы. Предсказание кандидатных цинк-зависимых сигнальных факторов осуществляли с использованием инструмента ZincBind, основанного на алгоритмах машинного обучения. Содержание отобранных факторов в образцах водянистой влаги пациентов с глаукомой измеряли методом иммуоблоттинга. Рекомбинантные белки получали путем экспрессии в бактериальной системе и выделения с помощью металл-аффинной хроматографии. Паттерны протеолитического процессинга отобранных факторов идентифицировали методом МАЛДИ масс-спектрометрии. Влияние цинка на активность вовлеченных протеиназ с исследовали с использованием флуорогенных субстратов.

Результаты. Предсказан ряд сигнальных белков (VGF, AGT, Myos, Wif1, IGF1, BDNF), потенциально способных связывать ионы цинка, а значит опосредовать его цитотоксическое действие. Среди них, только белок VGF (индуцируемый фактор роста нервов) демонстрировал прирост секреции в водянистой влаге пациентов с глаукомой. Показано, что связывание цинка стимулирует протеолитический процессинг VGF под действием катепсина L, ферментативная активность которого является не чувствительной к ионам этого металла. Продуктами цинк-зависимого протеолиза VGF могут быть пептиды NERP-4 и TQLP-21, обладающие выраженными нейропротекторными свойствами.

Выводы. Связывание цинка с прекурсором VGF усиливает его протеолитическую активацию, что может являться одним из защитных механизмов сетчатки в условиях глаукомной нейродегенерации.

БХ28. Хомогенетическая генерация пероксида водорода в астроцитах для изучения патогенеза нейродегенеративных заболеваний

У.В. Хлебникова (yuana.khlebnikova@mail.ru)^{1,2}, Д.И. Мальцев^{2,3}, О.В. Подгорный^{2,4}, В.В. Белоусов^{2,4}

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

²Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Россия, Москва

³Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Россия, Москва

⁴Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА РФ, Россия, Москва

Введение. Хронический окислительный стресс (ОС) в астроцитах может быть причиной нейродегенерации, однако его иницирующая роль в патологиях не подтверждена. Решению данной проблемы препятствует отсутствие моделей изолированного ОС в астроцитах головного мозга. Для создания изолированного ОС путем субстрат-зависимой продукции пероксида водорода может применяться инструмент на основе оксидазы D-аминокислот (DAAO) дрожжей *R. gracilis*. Поэтому цель настоящей работы — тестирование инструмента для хомогенетической генерации пероксида водорода в астроцитах.

Методы. Для проверки активности инструмента DAAO и биосенсор пероксида водорода HyPer7 доставляли с помощью аденоассоциированных вирусов (AAV) в клетки первичной культуры астроцитов. Уровень H_2O_2 в клетках оценивали по сигналу HyPer7. Специфичность экспрессии DAAO анализировали с использованием иммуногистохимического окрашивания срезов мозга, полученных после инъекций AAV в желудочки или зубчатую извилину мозга мышей.

Результаты. Доставка DAAO с помощью AAV в астроциты первичной культуры и обработка субстратом DAAO приводила к росту уровня внутриастроцитарного H_2O_2 . Таким образом, DAAO может быть использована для создания ОС в астроцитах. Внутривентрикулярные и интрацеребральные инъекции AAV векторов показали, что использованный gfa2 промотор обладает избирательной экспрессией в астроцитах. В гиппокампе мышей было выявлено много клеток с DAAO в NeuN-позитивных нейронах. Использование промотора gfaABC1D повысило специфичность экспрессии DAAO в астроцитах. Однако избирательно в области поля CA2 гиппокампа трансген все еще детектируется в некоторых нервных клетках.

Выводы. В первичной культуре астроцитов, экспрессирующих DAAO, наблюдается рост внутриклеточного количества пероксида водорода при внесении субстрата DAAO. Замена промотора gfa2 на gfaABC1D повышает специфичность экспрессии генетической конструкции в астроцитах, однако в отдельных нейронах поля CA2 экспрессия трансгена сохраняется.

ВХ29. Фитохромная регуляция сукцинатсемиальдегиддегидрогеназы и ГАМК-трансаминазы в зеленых листьях кукурузы (*Zea mays L.*)

З.Н. Шахов (zakharshakhov@gmail.com)¹, Г.Б. Анохина¹, А.Т. Епринцев¹

¹Медико-биологический факультет ВГУ, Россия, Воронеж

Введение. Адаптация к различному спектральному составу света является для растений жизненно необходимой для роста и развития. Фитохромы - класс фоторецепторов, которые аллостерически регулируются красным и дальним красным светом благодаря наличию хромофора. У *Arabidopsis* гены, кодирующие фитохромы, задействованы в регуляции прорастания семян, фотоморфогенезе проростков, времени цветения и различных светозависимых реакциях.

Методы. Облучение проростков. Растения помещали в камеру на 24 часа (темнота), после чего облучали красным (640–680 нм) и/или дальним красным (710–750 нм) светом в течение 15 мин, используя соответствующие светодиоды (Каскад-Электро, Москва, Россия). Экспонировали растения белым светом в течение 12 часов. Real-time ПЦР. ПЦР проводили на приборе LightCycler96 («Roche», Швеция) согласно протоколу производителя. Измерение активности ГАМК-Т. Активность ГАМК-Т определяли спектрофотометрически. Среда спектрофотометрирования содержала 0.1 мкМ пиридоксаль-5-фосфата, 5 мМ 2-оксоглутарата, 200 мкл фракции митохондрий из кукурузы, 4 мМ НАД⁺, Tris-HCl буфер (pH 8.5).

Результаты. При воздействии света относительный уровень транскриптов гена ССАДГ Ssadh-1 увеличивался почти в 10 раз по сравнению с темнотой. Красный свет вызывал увеличение концентрации транскриптов Ssadh-1 более чем в 20 раз, чем в темновом контроле. Дальний красный свет не привел к повышению экспрессии Ssadh-1, тогда как одновременное облучение красным и дальним красным светом индуцировало умеренное повышение уровня транскриптов Ssadh-1. Воздействие света вызывает увеличение транскриптов гена Ssadh-2 в 5 раз по сравнению с темновыми пробами. Облучение красным, дальним красным и одновременное облучение красным и дальним красным не оказало существенного влияния на транскрипционную активность Ssadh-2. Облучение красным светом приводило к увеличению активности гена ГАМК-Т Gta-2, дальний красный свет оказывал обратный эффект. Общая ферментативная активность ГАМК-Т на свету была в 1,2 раза выше темновых проб. Дальний красный свет и его одновременное воздействие с красным светом оказало схожее влияние на каталитическую активность ГАМК-Т.

Выводы. Выяснено, что функционирование ферментов ГАМК-шунта ССАДГ и ГАМК-Т имеет светозависимый характер. Ssadh-1 регулируется фитохромом, Ssadh-2 индуцируется на свету без участия фитохрома. Ген Gta-2 ГАМК-Т также имеет фитохром-зависимый механизм транскрипции.

БХ30. Разработка цинк-независимой формы нейротропного фактора

М.Л. Шишкин (mikhshishkin@gmail.com)^{1,2}, А.В. Мишин³, В.И. Борщевский³, Е.Ю. Зерный¹

¹*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Россия, Москва*

²*Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва*

³*Московский физико-технический институт (НИУ), Россия, Долгопрудный*

Введение. Нарушение гомеостаза цинка вызывает снижение нейротропной активности и развитие дегенеративных процессов в сетчатке. Мишенью мобильного цинка являются нейротропные факторы сетчатки (НФС), действие которых блокируется за счет образования олигомерных структур. Работа посвящена разработке и испытанию терапевтических форм НФС, лишенных чувствительности к ионам цинка.

Методы. Координаторы цинка предсказаны в трехмерной структуре НФС *in silico* с применением инструментов на базе искусственного интеллекта. Мутантные формы НФС с заменами координирующих аминокислотных остатков получены методами сайт-направленного мутагенеза, экспрессии в бактериальной системе и выделения с помощью высокоэффективной хроматографии. Термостабильность, цинк-связывающие свойства и четвертичная структура модифицированных НФС охарактеризованы методами дифференциальной сканирующей флуориметрии и динамического рассеивания света.

Результаты. НФС способны связывать ионы цинка в микромолярном диапазоне концентраций, что приводит к снижению температуры плавления и увеличению гидродинамического радиуса соответствующих белковых форм. Модифицированные варианты НФС с заменами предсказанных остатков теряют способность координировать цинк, а их термостабильность и четвертичная структура становятся нечувствительными к присутствию этого металла.

Выводы. Получены модифицированные формы НФС, лишенные чувствительности к ионам цинка. Указанные формы могут рассматриваться в качестве перспективных терапевтических агентов при нейродегенеративных заболеваниях сетчатки, способных эффективно компенсировать нейротропную активность в условиях цинкового стресса.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 24-15-00171

БХ31. Точность действия ДНК-полимеразы RB69 при синтезе с вытеснением цепи

А.О. Яковлев (a.yakovlev1@g.nsu.ru)^{1,2}, А.В. Юджина²

¹*Факультет естественных наук НГУ, Россия, Новосибирск*

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

Введение. ДНК-зависимые ДНК-полимеразы — ферменты, играющие ключевую роль во многих важных клеточных процессах. Репликативные ДНК-полимеразы отличаются крайне высокой точностью в отношении включаемого в растущую цепь нуклеотида. Как правило, при исследовании ДНК-полимераз распространено использование субстратов типа «праймер-матрица», что может репрезентировать синтез только на лидирующей цепи. В клетке зачастую реализуется синтез ДНК с вытеснением цепи полимеразой, например, в ходе процессинга фрагментов Оказаки или при длиннозаплаточном пути эксцизионной репарации оснований. Наличие вытесняемой цепи может в значительной степени сказываться на точности включения нуклеотидов, что было описано лишь для небольшого числа полимераз, в то же время в отношении субстратов с поврежденными азотистыми основаниями такие данные показаны не были. Отличной моделью ДНК-полимераз эукариот, участвующих в репликации, представляется ДНК-полимераза фага RB69 по причине высокой степени структурной гомологии (RB69 и Pol δ/ϵ относятся к семейству В) и более эффективной продукции в клетках *E. coli* в сравнении с эукариотическими белками.

Методы. Точность ДНК-полимеразы фага RB69 была исследована в условиях стационарной кинетики [1].

Результаты. Полученные данные стационарной кинетики показали следующее. Эффективность и точность включения нуклеотида напротив Ura не зависит от наличия вытесняемой цепи, однако в случае 8-охоGua и THF наблюдается значительное снижение эффективности синтеза ДНК. Точность включения нуклеотида в субстратах с 8-охоGua в значительной степени определяется наличием вытесняемой цепи, в то же время предпочтительное включение dATP напротив THF не изменяется между конструкциями. Термодинамические параметры дуплекса «матрица-вытесняемая цепь» оказывают значительное влияние на точность синтеза ДНК.

Выводы. Реализация вытеснительной активности может оказывать значительный эффект как на точность синтеза ДНК, так и на эффективность катализа ДНК-полимеразной реакции.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, грант № 23-74-10040.

Литература

[1] Goodman, M. F. et al. (1993) Biochemical basis of DNA replication fidelity, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol, 28, 2, 83-126.

Секция: Молекулярная и клеточная биология



МБ1. Эволюционные аспекты защиты и активации бактериальной системы защиты PARIS на примере T5 подобных бактериофагов

М.В. Александрова (marvlaaleksandrova@edu.hse.ru)^{1,2}, С.Ю. Белухина¹, Е.Д. Ухолкина^{1,2}, А.Б. Исаев¹

¹*Сколковский институт науки и технологий, Россия, Москва*

²*Национальный исследовательский институт ВШЭ, Россия, Москва*

Введение. Бактериофаги и бактерии ведут эволюционную гонку, в ходе которой открыты новые системы защиты. Фаговые факторы активации и ингибирования иммунных систем испытывают сильное давление отбора. Мы исследуем взаимодействие родственных фагов T5 и системы защиты PARIS (Phage Anti-restriction Induced defence System), чей эффектор — Toprim-нуклеаза — расщепляет тРНК *E. coli*, особенно тРНК^{Lys(UUU)}, ингибируя трансляцию и предотвращая развитие фага, но тРНК^{Lys(UUU)} фага T5 устойчива к этому механизму. Мы показываем, что фаговые тРНК помогают обходить иммунные системы, разрушающие хозяйские тРНК, а гомологичные белки родственных фагов сохраняют способность активировать PARIS, тогда как их тРНК утрачивают чувствительность к системе при минимальных мутациях.

Методы. Фаговые тРНК и белки мы заклонировали на индукционный вектор pBAD под контролем промотора araBAD с использованием метода Гибсона. Мутации в тРНК гены внесли с помощью метода KLD. Провели ЕОР (efficiency of plating) - анализ инфекционной активности фагов. С помощью биоинформатического анализа выявили родственников T5 фага с гомологичными триггерами PARIS.

Результаты. Анализ роли тРНК^{Lys(UUU)} в инфекции культуры PARIS+ показал, что система PARIS также нацелена на тРНК^{Asn(GUU)} и тРНК^{Thr(UGU)}. Мы показали, что совместная экспрессия этих трех тРНК с вектора позволяет даже фагу без тРНК генов (T7) избежать действия PARIS. Мы обнаружили родственников T5 фага с гомологичными белками-триггерами PARIS: Bas32, Bas33, Bas34 и BF23, и выявили, что только Bas32 защищен от PARIS. Однако его тРНК^{Lys(UUU)} не помогает обойти PARIS. Это показывает, что несколько мутаций в тРНК отличающих T5 тРНК^{Lys(UUU)} и Bas32 влияют на уязвимость тРНК к рестрикции эффектом PARIS. Дополнительный анализ показал, что мутации в области сайтов расщепления и связывания с эффектором по-разному влияют на обход PARIS.

Выводы. Результаты показывают, что эволюционное преимущество среди фагов с гомологичными триггерами PARIS получают те, у которых тРНК лучше модифицированы для предотвращения расщепления. Данные также подтверждают, что для обхода системы PARIS фагам необходим комплексный набор тРНК. Это подчеркивает роль сочетания нескольких тРНК в стратегии бактериофагов по уклонению от бактериального иммунитета.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 224-74-10089

МБ2. Дифференцировка эндотелиальных клеток из иПСК человека для васкуляризации нейральных органоидов

А.С. Баранова (mrsvinograd@gmail.com)^{1,2}, В.Г. Кругь^{1,2}, А.В. Иваненко³, В.С. Усатова²

¹*РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

²*ФЦМН ФМБА России, Москва, Россия*

³*НИЛ синтетических нейротехнологий НИИ трансляционной медицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

Введение. Создание аутологичных органоидов на основе дифференцированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) человека является перспективным направлением для заместительной терапии повреждений головного мозга. Создание капиллярной сети внутри нейральных сфероидов позволит не только поддерживать жизнеспособность, но и интегрировать их в физиологические процессы, происходящие в окружающих тканях. Капилляры преимущественно состоят из эндотелиальных клеток (ЭК), которые играют важную роль в регуляции сосудистой проницаемости, ангиогенеза и регенерации тканей.

Методы. В данной работе были реализованы два подхода дифференцировки иПСК человека в ЭК. Первый подход основан на внесении малых молекул, его начальная стадия - получение клеток мезодермы за счет активации WNT сигнального пути и дальнейшая спецификация ЭК в среде с добавлением факторов роста. Обогащение популяции CD31+ клеток эндотелия произведено методом клеточного сортинга при использовании конъюгированных антител. Второй подход был реализован благодаря индуцируемой гиперэкспрессии транскрипционного фактора ETV2. Для его осуществления была сконструирована плазида, содержащая целевой ген и флуоресцентный белок под rtTA зависимой системой tetO. Доставка вектора была выполнена методом липофекции, последующая селекция была реализована в среде с антибиотиком. Характеризация полученных линий была осуществлена методами иммуноцитохимического окрашивания и функционального теста на захват липопротеинов.

Результаты. В рамках реализации подхода на основе малых молекул подобран оптимальный протокол для эффективной дифференцировки, позволяющие получать ЭК из иПСК человека в течение 8 дней. Полученные клетки демонстрируют фенотип зрелых ЭК. В рамках реализации подхода с помощью индуцируемой экспрессии ETV2 были получены клональные клеточные линии, соответствующие целевому генотипу. В настоящее время оценивается возможность индуцированной экспрессии ETV2 в условиях нейральной дифференцировки при внесении в среду доксициклина с разной концентрацией и периодичностью.

Выводы. Дальнейшие исследования будут направлены на интеграцию полученных ЭК в состав нейральных сфероидов

МБЗ. Эффективность комбинации онколитического вируса VV-GMCSF-Lact и ингибитора киназы Akt1 в отношении клеток глиомы человека *in vitro*

А.А. Бывакина (a.byvakina@g.nsu.ru)^{1,2}, Н.С. Васильева¹, А.Б. Агеев¹

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

²*Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск*

Введение. Виротерапия является одним из наиболее перспективных подходов в лечении злокачественных новообразований различного гистогенеза, в том числе глиом. VV-GMCSF-Lact - рекомбинантный вирус осповакцины, который несёт инсерции генов ГМКСФ человека и апоптоз индуцирующего белка лактапина, а также демонстрирует высокую онкотоксическую активность и противоопухолевую эффективность в отношении глиомы человека как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако, несмотря на высокую эффективность виротерапии, существуют механизмы, способные обеспечивать устойчивость опухолевых клеток к действию онколитических вирусов. Мы показали, что культуры клеток глиом человека, наименее чувствительные к действию VV-GMCSF-Lact, имеют более высокий уровень активированной киназы Akt1, которая, в свою очередь, участвует в процессах ингибирования апоптоза. Таким образом, киназа Akt1 является привлекательной мишенью для таргетной терапии глиом в комбинации с VV-GMCSF-Lact.

Методы. Жизнеспособность клеток immortalized культур глиом человека U343MG и U87MG под действием VV-GMCSF-Lact и ингибитора киназы Akt1 перифозина оценивали, используя коммерческий набор Deep Blue Cell Viability Kit. Анализ апоптотических процессов в клетках, обработанных VV-GMCSF-Lact и перифозином, проводили методом проточной цитометрии при помощи набора «аннексин V - пропидий йодид».

Результаты. Показано, что добавление перифозина усиливает цитотоксический эффект VV-GMCSF-Lact в отношении клеток исследуемых культур глиом человека вне зависимости от концентрации вируса в среде. Анализ апоптотических процессов продемонстрировал, что ингибирование киназы Akt1 приводит к более эффективной гибели клеток глиом человека по апоптотическому пути под действием VV-GMCSF-Lact.

Выводы. Использование киназы Akt1 в качестве мишени для таргетной терапии в комбинации с VV-GMCSF-Lact является перспективным терапевтическим подходом в отношении глиом, поскольку усиливает апоптотическую гибель опухолевых клеток под действием вируса, а также позволяет уменьшить его дозу и как следствие минимизировать возможные токсические эффекты виротерапии, что важно при лечении внутричерепных опухолей.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 24-14-00390, <https://rscf.ru/project/24-14-00390/>

МБ4. Исследование комплекса на основе миРНК на модели риновирусной инфекции у мышей

К.В. Виноградова (v.katilla.v@yandex.com)^{1,2}, Е.Д. Тимотиевич¹, В.И. Ковчина¹, И.П. Шиловский¹

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Россия, Москва*

²*Московский физико-технический институт, Россия, Долгопрудный*

Введение. Риновирусы человека (HRV) — основные возбудители инфекций верхних дыхательных путей, вызывающие обострения хронических заболеваний, таких как астма. Из-за большого количества серотипов вакцинация против HRV невозможна, а специфические противовирусные препараты отсутствуют. [1] [2] Целью исследования стала разработка малых интерферирующих РНК (миРНК), направленных на консервативные участки генома риновируса, для подавления его репликации.

Методы. Анализ геномов HRV-A, HRV-B и HRV-C выявил наиболее консервативные участки в 5'UTR-регионе. На основе этих данных были спроектированы 125 вариантов миРНК, из которых 7 наиболее перспективных были синтезированы и протестированы *in vitro* на культуре клеток HeLa Ohio. Для доставки миРНК в клетки использовали катионный пептид-носитель КК-46. Эксперименты на модели риновирусной инфекции у мышей подтвердили эффективность комплексов миРНК/КК-46.

Результаты. Максимальным противовирусным эффектом обладали два спроектированных варианта миРНК, которые уменьшали титр вируса в 8 и 7 раз. По данным количественного ПЦР эти же варианты обеспечивали уменьшение количества копий вирусной РНК в 20 и 12 раз. Комплексы миРНК с пептидом КК-46 продемонстрировали значительное снижение вирусной нагрузки: титр вируса уменьшился в 61 раз, а количество копий вирусной РНК — в 14-42 раза. Обработка мышей комплексами siRV-5UTR-4-3/КК-46 и siRV-5UTR-5-3/КК-46 привела к значительному снижению вирусной нагрузки в легких и уменьшению воспалительных процессов в дыхательных путях.

Выводы. Таким образом, разработанные миРНК, нацеленные на консервативные участки генома риновируса, показали высокую противовирусную активность как *in vitro*, так и *in vivo*. Эти молекулы могут стать основой для создания эффективных противовирусных препаратов против HRV.

Исследование выполнено в рамках государственного задания при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства.

Литература

1. Rollinger J.M., Schmidtke M. Med Res Rev. 2011; 31(1):42-92. 2. Hayashi Y., et al., Viruses. 2022; 14(12):2616.

МБ5. Получение и сравнение биохимических свойств РНКаз НП *Thermus thermophilus*, *Geobacillus stearothermophilus* и *E. coli*.

А.А. Воронин (a.voronin2@q.nsu.ru)^{1,2}, И.П. Оскорбин¹, М.Л. Филипенко¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский университет, Новосибирск, Россия

Введение. РНКазы Н гидролизуют фосфодиэфирную связь между соседними рибонуклеотидами или между рНМФ и дНМФ в дуплексах РНК:ДНК. На практике РНКазы НП используются для повышения специфичности ПЦР и детекции продуктов реакции в методах изотермической амплификации нуклеиновых кислот. На данный момент разнообразие РНКаз НП изучено слабо, известные ферменты описаны фрагментарно и не проведено прямое сравнение свойств РНКаз НП из разных микроорганизмов. Таким образом, является актуальным систематическое сравнение уже известных РНКаз НП и описание биохимических свойств новых РНКаз НП из термофильных организмов, перспективных для практического применения.

Методы. Кодировующие последовательности РНКаз НП *Thermus thermophilus*, *Geobacillus stearothermophilus* и *E. coli* нарабатывали при помощи ПЦР и клонировали в вектор для экспрессии рЕТ23а посредством рестриктазно-лигазного метода. Отсутствие нуклеотидных замен в плазидах подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Рекомбинантные РНКазы НП нарабатывали в клетках *E. coli* штамма BL21 (DE3) pLysS и очищали металл-хелатной и ионообменной хроматографией. Субстратом для анализа активности РНКаз НП служил флуоресцентно-меченный ДНК-дуплекс с единичным рНМФ, продукты реакции разделяли денатурирующим ГЭФ в акриламидном геле.

Результаты. Было проведено клонирование, очистка и сравнение биохимических свойств РНКаз НП *T. thermophilus*, *G. stearothermophilus* и *E. coli*. Удельная активность РНКазы НП *G. stearothermophilus* — $6,1 \times 10^3$ ед. акт./мг, РНКазы НП *T. thermophilus* — $1,5 \times 10^4$ ед. акт./мг, и РНКазы НП *E. coli* — $5,8 \times 10^3$. Оптимальные условия для РНКазы НП *T. thermophilus* — 70 °C, pH 9,5, 25-50 мМ KCl, 3 мМ Mg²⁺; *G. stearothermophilus* — 50 °C, pH 9,5, 50 мМ NH₄Cl, 1 мМ Mn²⁺; *E. coli* — 30 °C, pH 9,5, 75 мМ KCl, 5 мМ Mg²⁺.

Выводы. Показано, что за счёт температурного оптимума не менее 60 °C и Mg²⁺ как предпочтительного кофактора РНКазы НП *Thermus thermophilus* является перспективной для детекции результатов LAMP с помощью гидролизующих зондов. В дальнейшем планируется провести клонирование и описание биохимических свойств РНКаз НП из других термофильных организмов с целью выбора оптимального фермента для практических приложений.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 125012300657-2.

МБ6. Клонирование, наработка и выделение белков для рекомбинантной полимеразной амплификации

Е.С. Галабурдина (e.galaburdina@g.nsu.ru)^{1,2}, И.П. Оскорбин^{1,2}, М.Л. Филипенко¹

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

²*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Россия, Новосибирск*

Введение. Рекомбинантная полимеразная амплификация (РПА) — метод изотермической амплификации нуклеиновых кислот. Тест-системы на основе РПА пригодны для быстрой диагностики заболеваний вне клинических лабораторий, однако на данный момент реагенты для РПА на территории РФ не производятся, что затрудняет разработку РПА-тестов. Целью работы было клонирование, наработка и очистка задействованных в РПА белков: рекомбиназы *uvrX* фага Т4; белка-продукта гена 32 фага Т4 (SSB-белка); фактора загрузки рекомбиназы *uvrY*; креатинкиназы типа М свиньи (КК-М).

Методы. Кодировующие последовательности КК-М свиньи и белка SSB фага Т4 клонировали в экспрессионный вектор pET23a рестриктазно-лигазным методом, отсутствие нуклеотидных замен в клонированных последовательностях устанавливали секвенированием по Сэнгеру. Экспрессионные плазмиды с кодировующими последовательностями *uvrX* и *uvrY* были ранее получены в лаборатории. Для оптимизации условий наработки *uvrX* и *uvrY* варьировали температуру инкубации с 1 мМ ИПТГ (18, 25, 37°C) и штамм *E. coli* — BL21 (DE3) pLysS и Rosetta Blue (DE3). В подобранных условиях нарабатывали белки в 1 л среды LB, после чего их очищали аффинной и ионообменной хроматографией на сорбентах Nuvia-IMAC и Macro-Prep DEAE.

Результаты. Получены экспрессионные плазмиды pET23a с кодировующими последовательностями SSB фага Т4 и креатинкиназы типа М свиньи. Отсутствие нуклеотидных замен, приводящих к аминокислотным заменам, подтверждено секвенированием по Сэнгеру. Оптимизированы условия наработки рекомбинантных белков *uvrX* (37°C, Rosetta Blue (DE3)), *uvrY* (37°C, BL21 (DE3) pLysS). Нарботаны и очищены с электрофоретической чистотой не менее 85% белки *uvrX* (6 мг белка из 3 г биомассы) и *uvrY* (18,45 мг белка из 4,3 г биомассы).

Выводы. Клонирование и очистка белков *uvrX*, *uvrY*, SSB фага Т4 и КК-М свиньи позволит получить полный набор белков для проведения РПА и локализовать на территории РФ производство компонентов для создания тест-систем на основе РПА.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 125012300657-2

МБ7. Сверхэкспрессия новой изоформы EML4-AS1 антисмысловой промоторной РНК гена EML4 в клетках линии немелкоклеточного рака легкого А549

А. Д. Дорфман (dorfman.ad@phystech.edu)^{1,2}, Е. М. Стасевич², М.М. Мурашко^{2,1}, Д. Э. Демин^{2,1}

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

²Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, Россия, Москва

Введение. Слияние генов *EML4-ALK* является наиболее частой хромосомной перестройкой в немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ). Белки семейства EML участвуют в формировании митотического веретена и интерфазной сети микротрубочек. В промоторной области гена *EML4* синтезируется антисмысловая РНК *EML4-AS1*, представленная 9 изоформами в геномной аннотации Ensembl 113. Известно, что некодирующие РНК могут являться ключевыми игроками в регуляции патологических процессов, в том числе раковых заболеваний. Изучение влияния промоторной РНК на экспрессию *EML4* и *EML4-ALK* может помочь в понимании молекулярных механизмов регуляции роста и лекарственной устойчивости раковых клеток, в частности несущих перестройку *EML4-ALK*.

Методы. Изоформы *EML4-AS1* амплифицировали из кДНК клеток А549 (Epcyclo PCR Kit, Евроген). Новая изоформа (отсутствующая в Ensembl) секвенирована и клонирована в pcDNATM3.1/Hygro(+) под CMV-промотором. Клетки А549 культивировали в DMEM с 10% FBS и антибиотиками. Для трансфекции 2×10^6 клеток подвергали электропорации с 2 мкг плазмид. Жизнеспособность оценивали через 24 ч на анализаторе xCelligence DP (Agilent) (5×10^3 клеток/лунка). Тотальную РНК выделяли через 24 ч (Extract RNA, Евроген), синтезировали кДНК (MMLV RT kit, Евроген), анализировали с помощью ПЦР (CFX96, Bio-Rad).

Результаты. В клетках А549 была обнаружена неописанная ранее изоформа промоторной РНК *EML4-AS1*, которая имеет комплементарную часть с мРНК гена *EML4*. При сверхэкспрессии данной изоформы *EML4-AS1* наблюдалась тенденция к снижению экспрессии мРНК гена *EML4*. При проведении функционального теста на рост была замечена тенденция к снижению жизнеспособности клеток.

Выводы. По предварительным данным, сверхэкспрессия неописанной ранее изоформы *EML4-AS1* снижает экспрессию *EML4* и пролиферацию клеток линии НМРЛ А549. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов взаимодействия *EML4-AS1* с геном *EML4* может быть полезно для разработки новых стратегий воздействия на *EML4-ALK*-позитивные опухоли.

МБ8. Изменение тиаминового метаболизма после бариатрической хирургии

А.А. Емельянова (a_etelyanova_03@mail.ru)¹, В.И. Бунник^{2,3} ¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³ПМГМУ имени И.М. Сеченова, Россия, Москва

Введение. Бариатрическая хирургия, в частности желудочное шунтирование, часто вызывает дефицит тиамина (витамина В1). Цель данной работы – изучить влияние бариатрии на тиамин-зависимый метаболизм кишечника.

Методы. Оценивали экспрессию тиаминовых транспортеров, ферментов, использующих в качестве кофермента тиаминдифосфат (ТДФ), а также белков, осуществляющих превращения тиамина. Использовали данные транскриптомики из GEO через 1 (GSE113819) и 6-9 (GSE214758) месяцев после шунтирования. Для сравнения уровней экспрессии белков в разных экспериментах, уровни белковых мРНК были нормализованы на сумму транскриптов GAPDH+ACTB+TUBA1A. Сигналы мРНК для этих транскриптов были сопоставимы между собой и в использованных наборах независимых данных.

Результаты. Через месяц после желудочного шунтирования в энтероцитах тощей кишки не наблюдается существенных изменений в уровне транскриптов исследуемых белков. Тем не менее, сравнение уровней мРНК выявляет снижение уровней транскриптов белков транспорта тиамина и ТДФ-зависимых в ряду: ALPI > SLC19A1 > OGDH > HAC11 > SLC22A5. Это указывает на изменения, затрагивающие тиамин-зависимый метаболизм. Кластеризация наборов данных выделяет 3 группы транскриптов – высокого, низкого и среднего уровней экспрессии. Транскрипты белков, которые сходимо снижаются через месяц после шунтирования, принадлежат к белкам с высокой (ALPI, OGDH, HAC11, SLC22A5) или средней (SLC9A1) экспрессией. Через 6-9 месяцев после желудочного шунтирования наблюдается значительное увеличение уровня мРНК для большинства тиамин-зависимых белков. Такая метаболическая перестройка может свидетельствовать о компенсации возникающего в энтероцитах после бариатрии дефицита тиамина.

Выводы. Бариатрическая хирургия связана с долгосрочными изменениями транскриптома тиамин-зависимых белков. Небольшое снижение уровней мРНК для ряда таких белков через месяц после операции сменяется значительным увеличением мРНК множества тиамин-зависимых белков через 6-9 месяцев. Данные изменения могут отражать компенсаторный ответ на возникающий в энтероцитах после желудочного шунтирования дефицит тиамина.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В.Ломоносова

МБ9. Исследование экспрессии генов редокс систем в нейросфероидах с помощью РНК-секвенирования

О.А. Иванов (*pdс.msu@gmail.com*)¹, В.С. Усатова², О.М. Кудряшова²

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Россия, Москва

²ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства, Россия, Москва

Введение. В данном исследовании мы анализируем прототипы нервных тканей в формате сфероидов – многоклеточных самоорганизующихся трёхмерных культур, которые имитируют структуру и функцию ткани. В клетках существует система регуляции работы белков за счет окисления и восстановления, получившая название редокс сигналинга. На данный момент актуальной темой является роль этой системы в развитии мозга. Повышение активных форм кислорода (АФК) в нейральных стволовых клетках приводит к индукции дифференцировки и выходу из клеточного цикла, что свидетельствует о важной роли редокс статуса в поддержании баланса между пролиферацией и нейрогенезом. Таким образом, мы решили выяснить, как изменяется экспрессия генов редокс систем на разных стадиях развития нейральных сфероидов.

Методы. Было проведено РНК-секвенирование четырех групп образцов: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) человека, нейральные предшественники (NPC), нейральные сфероиды возрастом 3 недели (до нейрональной индукции) и 6 недель (спустя 3 недели после индукции).

Результаты. Мы провели анализ дифференциальной экспрессии и увидели, что при дифференцировке нейросфероидов происходит снижение экспрессии генов гликолиза и пентозо-фосфатного шунта и повышение экспрессии генов окислительного фосфорилирования, основного пути образования АФК. Другой источник АФК это оксидазы клетки, в частности, ферменты семейства NOX. В NPC была повышена экспрессия *NOX4*, а в сфероидах – компонентов комплекса NOX2 и гена *DUOX1*. Это может говорить о специфичности экспрессии изоформ *NOX* на разных стадиях развития нейросфероидов. Кроме того, в них наблюдались различия в экспрессии и по другим оксидазам из различных клеточных компартментов. Важный вклад в редокс состояние клетки вносят также антиоксидантные системы белков. Мы наблюдали выраженное понижение экспрессии изоформ *PRDX* (1-4, 6), *GPX* (1, 4, 7, 8) и *TXN2* в ходе дифференцировки NPC в нейроны и, наоборот, увеличение экспрессии *SOD2* и *GLRX* в сфероидах 3 и 6 недель.

Выводы. Таким образом, анализ данных РНК секвенирования свидетельствует, что при дифференцировке нейронов в модели нейросфероидов происходит изменение редокс статуса клеток.

МБ10. Участие компонентов внеклеточных везикул в нарушении адипогенной дифференцировки при старении

С.С. Каменков (kams200303@gmail.com)¹, Е.С. Чечехина¹

¹ *Факультет фундаментальной медицины Медицинского научно-исследовательского института, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Введение. Для поддержания метаболического здоровья необходимо обновление жировой ткани, за которое ответственны мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК). Они являются предшественниками адипоцитов и регулируют гомеостаз ткани с помощью секретируемых факторов. С возрастом МСК утрачивают регуляторный потенциал и приобретают секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP). Ранее мы показали, что факторы, секретируемые сенесцентными МСК в составе ВВ, снижают эффективность адипогенной дифференцировки [1]. Однако, молекулярные механизмы, опосредующие данные нарушения, оставались невыясненными.

Методы. Сенесцентные и молодые МСК получены от доноров > 65 лет и < 45 лет соответственно. Концентрат ВВ получали ультрафильтрацией культуральной среды после кондиционирования клеток в течении 2 суток. Уровень белков оценивали вестерн-блоттингом. Разделение ядерной и цитоплазматической фракций осуществляли методом высаливания.

Результаты. В данной работе мы изучали механизмы нарушения адипогенной дифференцировки под воздействием факторов, секретируемых во ВВ сенесцентных МСК. Методом вестерн-блоттинга нами было выявлено повышение р-Akt в клетках, обработанных ВВ сенесцентных МСК. При поиске молекул, ответственных за эти изменения, мы обнаружили, что ВВ сенесцентных клеток обогащены микроРНК, регулирующими экспрессию PTEN. Несмотря на это, добавление ВВ сенесцентных МСК повышало уровень PTEN. Методами вестерн-блоттинга и иммуноцитохимического окрашивания мы обнаружили, что изменения происходили за счет его ядерной фракции.

Выводы. Таким образом, мы показали, что мишенями молекул, переносимых в составе ВВ сенесцентных МСК, являются Akt и PTEN. Наблюдаемое повышение базального уровня активации Akt приводит к инсулинорезистентности. Несмотря на высокий уровень микроРНК, регулирующих PTEN, добавление ВВ вызывает увеличение ядерной фракции данного белка. Вероятно, данный феномен является компенсаторным механизмом, направленным на поддержание генетической стабильности и предотвращение неконтролируемой пролиферации в условиях нарушенного инсулинового сигналинга.

Данная работа поддержана грантом РНФ #19-75-30007 Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека (<https://rscf.ru/project/19-75-30007/>)

Литература

1. Vaynova E et al. Front. Cell Dev. Biol. 2022.

МБ11. Повышение экспрессии днРНК NEAT1 ассоциировано с устойчивостью к доцетакселу при раке предстательной железы на фоне ингибирования Wnt-сигналинга

И.В. Катунина (i.katunina125@gmail.com)^{1,2}, Е.А. Пудова² ¹Национальный исследовательский университет ИТМО, Россия, Санкт-Петербург

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, Москва

Введение. Сигнальный путь Wnt играет ключевую роль в регуляции жизне-способности опухолевых клеток, контролируя процессы пролиферации, апоптоза, миграции, инвазии и клеточного гомеостаза. Недавние исследования показали его участие в формировании устойчивости к различным химиотерапевтическим агентам, включая таксаны, при раке предстательной железы (РПЖ). Ингибирование Wnt сигнального пути рассматривается как перспективная стратегия для преодоления химиорезистентности. Длинные некодирующие РНК (днРНК) играют важную роль в регуляции опухолевого роста и устойчивости к терапии. Цель исследования — идентифицировать днРНК, ассоциированные с развитием химиорезистентности к доцетакселу (DTX) в случае РПЖ, в том числе на фоне ингибирования Wnt сигнального пути с помощью XAV-939.

Методы. Экспериментальные подлинии РС3 клеток были получены в результате культивирования с градиентным повышением концентрации DTX в питательной среде: 10 нМ DTX – резистентные РС3 клетки, 10 нМ DTX+ 2,5 мкм XAV-939 – комбинированное воздействие. Тотальная РНК была получена с помощью набора RNeasy Micro Kit (Qiagen). Проведена подготовка мРНК библиотек с помощью набора KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboErase (Roche) с последующим высокопроизводительным секвенированием на приборе NextSeq 2000. Анализ дифференциальной экспрессии выполнен с помощью пакета DESeq2. Результаты считали статистически значимыми при $FDR < 0,05$.

Результаты. Анализ дифференциальной экспрессии выявил статистически значимое увеличение уровня транскрипта *NEAT1* в резистентных к DTX клетках по сравнению с контрольными образцами ($\text{Log}_2\text{FC} = 0,52$). В группе комбинированного воздействия DTX+XAV-939, экспрессия *NEAT1* демон-стрировала еще более выраженное повышение ($\text{Log}_2\text{FC} = 1,96$).

Выводы. Статистически значимое повышение экспрессии *NEAT1* в резистентных к DTX клетках и ее дальнейший рост при ингибировании Wnt-сигналинга с помощью XAV-939 могут указывать на компенсаторный механизм адаптации опухолевых клеток к терапевтическому стрессу. Это подтверждает потенциальную роль *NEAT1* в поддержании химиорезистентности, что делает ее перспективной мишенью для дальнейших исследований.

МБ12. Биологическая активность аллогенных MSC и модифицированных NK клеток в отношении глиобластомы.

Д.П. Кирсова (dashakirsova@yandex.ru)¹, Т.В. Бойко¹

¹ *Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, Россия, Москва*

Введение. Глиобластома является самой распространенной и агрессивной опухолью головного мозга, в настоящее время лечением является резекция опухоли с последующей комбинацией темозоломида и лучевой терапии. Стандартное лечение имеет низкую эффективность, поэтому идет поиск новых подходов. Иммунотерапия – перспективное направление в лечение глиобластомы. Данный подход имеет ряд преимуществ, например, возможность долгосрочной ремиссии, персонализированное лечение, таргетный подход в отношении опухолевых клеток.

Методы. Цель работы: оценить эффективность проводимой иммунотерапии на сингенной (C6-глиома, GL261) и ксенографтной модели глиобластомы. Работа выполнена на линиях мышей C57Bl/6, NOD/SCID (виварий НИИ ЭО и БМТ, Нижний Новгород) и крысах (Wistar). В ходе эксперимента мышам C57Bl/6 ортотопически имплантировали глиому GL261, меченную mScarlet (Stereotaxis, RWD); крысам ортотопически имплантировали глиому C6; мышам линии NOD/SCID имплантировали первичные клетки глиобластомы человека, меченные mKate2. Группы животных сканировались при помощи МРТ, до момента, когда опухоль будет четко визуализироваться. После этого группе крыс внутривенно вводили МСК, меченные частицами железа (конъюгированными с Rhodamine B/EvaGreen); мышам линии C57Bl/6 вводили внутривенно МСК, меченные DYE 670; мышам линии NOD/SCID вводили внутривенно NK-CAR, меченные DYE 670. Далее мозг извлекали и делали криотомные срезы для последующей иммуноцитохимии. Результаты ИЦХ оценивали конфокальной лазерной микроскопией (Nikon Eclipse Ti-2).

Результаты. Результаты проведенной конфокальной микроскопии на срезах ГМ с глиомы сингенной модели позволили подтвердить адресную доставку в зону опухоли меченых аллогенных МСК. Для линии NOD/SCID показали возможность доставки модифицированных NK клеток.

Выводы. Полученные результаты способствуют развитию иммунотерапии глиобластомы, поскольку она позволяет стимулировать иммунную систему для распознавания и уничтожения опухолевых клеток, что может улучшить выживаемость и предотвратить рецидивы заболевания.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ (№22-64-00057) “Комбинированная терапия экспериментальной глиобластомы с помощью «усиленных» NK-клеток, активированных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и модифицированных онколитических вирусов”

МБ13. Интеркалированные мотивы в промоторах/UTR протоонкогенов и генов нейропластичности как рН-чувствительные регуляторы транскрипции

Е.К. Книжник (*knizhnik.ek@phystech.edu*)^{1,2}, В.А. Сапожникова³, Д.А. Широков², Ю.М. Ходарович⁴

¹Московский физико-технический институт, Россия, Долгопрудный

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

³Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Россия, Москва

⁴Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

Введение. Интеркалированные мотивы (iM) – элементы вторичной структуры цитозин-богатых фрагментов ДНК. Синтетические iM могут играть роль рН-сенсоров *in vitro*. Мы предположили, что в клетке геномные iM выполняют сходную функцию, регулируя транскрипцию при изменении уровня кислотности среды. Примером подобных изменений служит накопительный эффект от скачков рН при многократном возбуждении нейронов; он может являться стартовой точкой активации генов синаптогенеза и нейропластичности. Цель работы – прояснение роли iM в рН-зависимой регуляции транскрипции протоонкогенов и генов нейропластичности.

Методы. Отбор iM проводился на основании картирования методом Cut&Tag и вероятности iM-фолдинга. Отобранные iM были синтезированы в виде коротких олигонуклеотидов (ОДН) и встроены в плазмиду с репортерным геном – Firefly (FLuc). Подтверждение iM-фолдинга *in tube* проводилось методом спектроскопии кругового дихроизма (КД) с ранжированием рН или с добавлением дестабилизатора iM. Для оценки влияния iM на транскрипцию клетки НЕК293 были трансфицированы референсной плазмидой с Renilla (Rluc), и целевой плазмидой FLuc без iM или с мутантным iM. Соотношение Fluc:Rluc оценивалось с помощью двойного люциферазного теста (ДЛТ).

Результаты. Были отобраны потенциально значимые iM из промоторов/UTR протоонкогенов, а также ассоциированного с синаптопластичностью гена. КД-спектроскопия подтвердила их стабильность в слабокислой среде и дестабилизацию в присутствии лиганда. ДЛТ показал, что в iM-вставка приводит к незначительному снижению экспрессии репортерного гена. В модели острого ацидоза эффект проявлялся более отчетливо – предположительно, за счет стабилизации iM. Эти данные подтверждают роль iM как геномных рН-сенсоров и репрессоров транскрипции.

Выводы. На примере четырех картированных в геноме iM с подтвержденной рН-чувствительностью было показано рН-зависимое подавление экспрессии репортерного гена в модельной конструкции. Результаты указывают на возможное участие iM в регуляции транскрипции при ацидозе.

МБ14. Функциональный анализ транскрипционного фактора CsqR в *Escherichia coli*

А.Е. Колонский (A.Kolonsky@skoltech.ru)¹, Е.С. Трубников², А.М. Дукам¹, Д.С. Коршунов²

¹Сколковский институт науки и технологий, Россия, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Сульфоглюкоза — широко распространённое сероорганическое соединение, катаболизируемое бактериями. У *E. coli* ферменты и транспортеры катаболизма этого соединения закодированы в *yih*-локусе, а их экспрессия контролируется глобальным регулятором cAMP-CRP и локальным регулятором CsqR (YihW). У пробиотического штамма *E. coli* Nissle 1917 *yih*-кассета укорочена по сравнению с диким типом (10 генов) и включает в себя 4 гена — *yihU* (редуктаза), *yihT* (альдолаза), *yihV* (киназа) и *yihW*, а последовательность гена CsqR совпадает с аналогичной последовательностью дикого типа на ~70%, что может указывать на функциональные различия. Цель работы — получение рекомбинантного CsqR (YihW) из *E. coli* Nissle 1917 для изучения его функциональной активности.

Методы. Сконструировали два варианта плазмиды на основе вектора *pGEMEX* — с регуляторной областью гена *yihW* и без неё. Фрагменты гена амплифицировали с праймерами, содержащими сайты рестрикции XbaI, с использованием высокоточной полимеразы Genta HS-UltraSP(U) Фьюжн. Затем фрагменты были выделены из геля набором Monarch и подвергнуты рестрикции, как и плаزمида. Лигировали (3:1) T4-лигазой. Лигазной смесью трансформировали *E. coli* DH5 α , высевая клетки на чашки с ампициллином. Для проверки вставки применяли ПЦР с праймерами к T7-промотору и терминатору, а отсутствие мутаций подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Полученные конструкции трансформировали в *E. coli* BL21 (DE3) и BL21 (DE3) Codon Plus RIL для экспрессии белка.

Результаты. Поскольку факторы транскрипции являются проблемными белками для экспрессии, было проверено два штамма, два времени индукции и три концентрации IPTG. На основе кривых роста и электрофореза белков было установлено, что оптимальная экспрессия CsqR в растворимой фракции достигалась в штамме BL21 (DE3) Codon Plus RIL при 100 мкМ IPTG в течение 16 часов, белок лучше экспрессировался с плазмиды без регуляторной области. Очистку проводили аффинной хроматографией на Ni-NTA сефарозе. Функциональность белка подтверждена электрофорезом с задержкой в геле (EMSA): CsqR специфически связывается с целевыми регуляторными участками ДНК, причём связывание зависит от присутствующих сахаров.

Выводы. Результаты позволяют оценить, как структурные изменения CsqR из *E. coli* Nissle 1917 отражаются на его функциональной активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-14-00276

МБ15. Поли(ADP-рибозил)ирование рибосомных белков человека ферментами PARP1 и PARP2 *in vitro*

А.С. Красников (aka2014s@mail.ru)^{1,2}, К.Н. Науменко¹

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

²*Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск*

Введение. Поли(ADP-рибозил)ирование (PAR-илирование) – модификация, представляющая собой присоединение к белку звеньев ADP-рибозы, и осуществляемая ферментами семейства PARP. Наиболее изученными являются белки PARP1 и PARP2. Их ко-фактором выступает белок HPF1, изученный ранее только в контексте модификаций гистонов. По данным протеомных исследований многие рибосомные белки PAR-илируются ферментами PARP1/2. Однако пока больше вопросов, чем ответов. Так, неизвестно PAR-илируются ли белки в составе рибосомных субчастиц или за ее пределами? Какова роль HPF1 в модификации рибосомных белков? Существуют ли взаимосвязи между PAR-илированием гистонов и рибосомных белков? Наконец, в чем может заключаться роль PAR-илирования рибосомных белков в клетке?

Методы. 60S и 40S субчастицы рибосом были выделены из плаценты человека с последующим выделением из них суммарного рибосомного белка с использованием процедуры, основанной на экстракции белков уксусной кислотой. Реакционные смеси, содержащие 40S/60S субчастицы или суммарный белок, PARP1/2, HPF1, ДНК и [³²P]NAD⁺, инкубировали с последующим разделением радиоактивно-меченных продуктов реакции PAR-илирования в полиакриламидном геле, и дальнейшей автордиографией.

Результаты. Показано, что суммарный белок из 60S/40S субчастиц рибосомы человека подвергается PAR-илированию PARP1/2 только в присутствии поврежденной ДНК. Белки в составе рибосомных субчастиц не PAR-илируются. Выяснено, что для эффективного PAR-илирования суммарного белка 60S субчастиц необходим HPF1, а в случае суммарного белка 40S субчастиц модификация эффективно происходит и без него. Показано, что HPF1 переключает специфичность PAR-илирования белков из обеих субчастиц PARP1/2 на остатки Ser/Тут. Мы наблюдаем разницу в селективности PAR-илирования: модификации подвергается большая часть белков 40S субчастицы, тогда как в случае белков 60S субчастицы модифицируются лишь несколько из них. Показано, что гистоны подавляют модификацию рибосомных белков, причем в большей степени в случае PARP2, чем PARP1.

Выводы. Рибосомные белки человека PAR-илируются PARP1/2 только будучи вне субчастиц рибосом и только в присутствии поврежденной ДНК. PAR-илирование белков из 60S и 40S субчастиц происходит по-разному, как в плане зависимости эффективности реакции от их концентрации и HPF1, так и в плане селективности по отношению к определенным белкам.

МБ16. Реакция обратной транскрипции с переключением матрицы для выявления вариантов химерных транскриптов

О.М. Курченко (*o.kurchenko@g.nsu.ru*)¹, И.К. Шалик¹

¹Новосибирский Государственный Университет, Россия, Новосибирск

Введение. Хромосомные перестройки приводят к образованию слияний генов и соответствующих химерных транскриптов, которые транслируются в белки с аномальной активностью. Эти события играют ключевую роль в эволюции опухоли, определяя ее фенотип и патогенез заболевания. В связи с этим химерные транскрипты являются значимыми прогностическими и предиктивными маркерами. Для выявления химерных транскриптов используются методы высокопроизводительного секвенирования РНК. Однако современные подходы многоэтапные и отличаются высокой стоимостью. Кроме того, для анализа необходимо получить двухцепочечную кДНК по матрице РНК. Но из-за наличия альтернативных партнеров по слиянию невозможно подобрать специфичный праймер для синтеза второй цепи кДНК.

Методы. Мы предлагаем использовать реакцию обратной транскрипции с переключением матрицы при создании таргетных библиотек кДНК для выявления химерных транскриптов. Данный метод основывается на способности обратной транскриптазы вируса мышиного лейкоза в определенных условиях добавлять остатки цитозина к 3'-концу синтезируемой кДНК. При добавлении в систему олигонуклеотида с полигуаниновым трактом он может комплементарно присоединяться к кДНК и становится матрицей для продолжения синтеза. Так в один этап образуется одноцепочечная кДНК, фланкированная техническими последовательностями. Это позволяет синтезировать вторую цепь кДНК в ПЦР и исключает стадию лигирования адаптеров.

Результаты. Мы проанализировали влияние ряда биохимических факторов на эффективность реакции обратной транскрипции с переключением матрицы. Установлено, что ионы марганца (Mn^{2+}) играют ключевую роль в смещении хода реакции в сторону возникновения продуктов переключения. Затем были оптимизированы дальнейшие шаги подготовки таргетных библиотек кДНК. На основе полученной системы оценена применимость реакции обратной транскрипции с переключением матрицы при подготовке библиотек кДНК для анализа химерных транскриптов. В качестве модели выбран химерный ген *BCR-ABL1*, обнаруживаемый у 95% пациентов с хроническим миелоидным лейкозом. Была разработана панель праймеров, таргетированная на транскрипты, включающие ген *ABL1*, для мультиплексной обратной транскрипции с переключением матрицы. Используя эту панель и предложенный метод, а также программы STAR-fusion и IGV нам удалось специфично обнаружить химерные транскрипты гена *BCR-ABL1* в клетках линии K562 и верно определить его изоформу (e14a2).

Выводы. Итак, впервые реакция обратной транскрипции с переключением матрицы успешно адаптирована для решения значимой медицинской задачи.

МБ17. Эпигенетическая регуляция альтернативного сплайсинга генов синаптической пластичности в культурах нейронов

Ю.А. Леонтович (uleontov@gmail.com)¹, А.П. Белецкий¹, П.М. Балабан¹, А.А. Бородинова¹

¹Лаборатория клеточной нейробиологии обучения, ИВНД и НФ РАН, Россия, Москва

Введение. Долговременные пластические процессы в нервной системе могут сопровождаться изменением экспрессии целого ряда генов, обеспечивающих структурные и функциональные перестройки в сети нейронов. Перестройки могут быть следствием изменения транскрипции генов, а также регуляции их сплайсинга. В нервной системе описано влияние представленности отдельных изоформ белков на структуру синапсов, чувствительность мембран, везикулярный транспорт и другие аспекты. В своей работе мы исследовали влияние эпигенетических перестроек, вызванных действием ингибитора гистондеацетилаз, на альтернативный сплайсинг генов синаптических белков и функционирование нейронной сети.

Методы. Исследования были проведены на первичных культурах нейронов, выделенных из коры головного мозга новорожденных крыс. На 14 день культивации культуры инкубировали в течение 19 часов с ингибитором гистондеацетилаз трихостатином А (TSA). Образцы были использованы для РНК-секвенирования на платформе Illumina, для анализа альтернативного сплайсинга генов синаптической пластичности данные были обработаны с помощью пакета программ DEXSeq R-package. Полученные данные биоинформатического анализа мы подтверждали в ходе qPCR на отдельные гены-мишени. С помощью кальциевого имаджинга анализировали параметры сетевой активности нейронов.

Результаты. Методом qPCR были подтверждены ранее полученные данные РНК-секвенирования для генов синаптических белков: белка адгезии (*Nrxn2*), скаффолд-белка, ассоциированного с постсинаптической мембраной (*Shank2*), и регулятора сигнальных путей в постсинаптическом окончании (*Synap1*). Кальциевый имаджинг показал повышение синхронности активности нейронов при неизменной средней частоте кальциевых событий в культурах после обработки TSA.

Выводы. Получены новые данные о влиянии эпигенетической регуляции на альтернативный сплайсинг генов синаптической пластичности. Показано, что молекулярные перестройки, индуцируемые ингибитором гистондеацетилаз трихостатином А, повышают синхронность активности нейронов в сети.

Работа выполнена при поддержке гранта № 075-15-2024-548 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

МБ18. Участие белка Nup93 в регуляции транскрипции экдизон-зависимых генов *Drosophila melanogaster*

В.А. Мандыбура (vitmandybura@gmail.com)

Группа динамики транскрипционных комплексов, Институт биологии гена, Россия, Москва.

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

Введение. Для *Drosophila melanogaster* было установлено, что белки-компоненты ядерной поры не только участвуют в ядерном молекулярном транспорте, но и активно регулируют транскрипцию генов. В частности, некоторые компоненты ядерной поры взаимодействуют с регуляторными участками ДНК (промоторами и энхансерами) генов, транскрипция которых контролируется стероидным гормоном 20-гидроксиэкдизоном (20E) (Pascual-Garcia et al., 2017). Недавние исследования показали, что белок Nup93, компонент комплекса ядерной поры, присутствует не только на энхансерах, но и на регуляторных "PRE"-элементах, что позволяет предположить его важную роль в репрессии 20E-зависимых генов у *Drosophila melanogaster* (Gozalo et al., 2020).

Методы. Ко-иммунопреципитация, ChIP-Seq, колончатая хроматография.

Результаты. Результаты ко-иммунопреципитации показали, что белки Nup93 и экдизоновый рецептор EcR действительно взаимодействуют в отсутствие экдизона. Это указывает на возможное участие Nup93 в механизмах репрессии транскрипции 20E-зависимых генов при отсутствии гормона.

Анализ ChIP-Seq выявил, что Nup93 локализуется в регуляторных участках 20E-зависимых генов дрозофилы. Основными сайтами его связывания оказались «паузированные» промоторы и инсуляторы, что указывает на его возможную роль в регуляции транскрипционной активности этих генов.

Выводы. Полученные результаты указывают на участие Nup93 в регуляции гормон-зависимых генетических элементов у *Drosophila melanogaster*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-14-00184).

Литература

1.1. Gozalo A, Duke A, Lan Y, Pascual-Garcia P, Talamas JA, Nguyen SC, Shah PP, Jain R, Joyce EF, Capelson M. 2020. Core Components of the Nuclear Pore Bind Distinct States of Chromatin and Contribute to Polycomb Repression. *Molecular Cell* 77: 67-81.e7. 2. Pascual-Garcia P, Debo B, Aleman JR, Talamas JA, Lan Y, Nguyen NH, Won KJ, Capelson M. 2017. Metazoan Nuclear Pores Provide a Scaffold for Poised Genes and Mediate Induced Enhancer-Promoter Contacts. *Molecular Cell* 66: 63-76.e6.

МБ19. Моноциты и холангиоциты человека как модели для изучения регуляторной роли микроРНК внеклеточных везикул трематод *Opisthorchis felineus*

Е.В. Медведева (tulenfedorovich@gmail.com)^{1,2}, Е.А. Лишай^{1,2}, О. Запарина², М.Ю. Пахарукова^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. Трематоды *Opisthorchis felineus* вызывают у человека описторхоз, хроническое течение которого может приводить к неоплазии эпителия желчных протоков. Внеклеточные везикулы трематод способны поглощаться клетками хозяина и содержат различные регуляторные компоненты, в том числе молекулы микроРНК, являющиеся потенциальными регуляторами генов-мишеней человека. Цель работы - выявление микроРНК внеклеточных везикул *O. felineus*, оценка их интернализации в клетки человека и изучение их регуляторных свойств.

Методы. Из среды содержания трематод *O. felineus* выделяли внеклеточные везикулы, анализировали их морфологию с помощью просвечивающей электронной микроскопии, содержание маркера экзосом CD63 определяли с помощью вестерн-блоттинга. Малые РНК выделяли из внеклеточных везикул, кДНК-библиотеки секвенировали на платформе DNBSEQ. Для идентификации микроРНК использовали алгоритм miRDeep2. Проводили эволюционный анализ с помощью базы данных miRBase. Поиск генов-мишеней в геноме человека осуществляли в TargetScan и miRDB. В качестве клеточных моделей использовали линию холангиоцитов человека H69 и линию моноцитов человека THP-1. Исследовали интернализацию флуоресцентно-меченых везикул в клетки человека с помощью флуоресцентной и конфокальной микроскопии и РНК-гибридизации *in situ*.

Результаты. В составе внеклеточных везикул выявлено 97 микроРНК, из них наиболее представленными являлись Ofe-Mir-277-P2, Ofe-Mir-71-P1, Ofe-Bantam, Ofe-Mir-10-P1, Ofe-Mir-219, Ofe-Mir-7-P1. Среди мажорных микроРНК представлены как консервативные для всех видов первично- и вторичноротых (Ofe-Mir-10-P1), так и специфичные для паразитических червей (Ofe-Bantam). Для каждой из мажорных молекул предсказаны гены-мишени в геноме человека: наибольшее количество для Ofe-Mir-277-P2a (426 генов), наименьшее - для Ofe-Mir-Bantam (6 генов). Показана интернализация внеклеточных везикул и микроРНК *O. felineus* в холангиоциты H69 и моноциты THP-1.

Выводы. Определен состав микроРНК внеклеточных везикул *O. felineus*, предсказаны гены-мишени в геноме человека. Впервые показана интернализация внеклеточных везикул *O. felineus* в клетки THP-1 и H69. С помощью гибридации *in situ* показано, что микроРНК трематод обнаруживается в клетках человека.

МБ20. Влияние нокаута гена *Ube2a* на подвижность и морфологию нейронов в процессе эмбрионального кортикогенеза мыши

Р. В. Миронов (*tausekoenig@yandex.ru*)¹, А. Д. Ульянов², А. О. Кустова³, Е. В. Емец¹

¹Лаборатория клеточной биологии, ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина, Россия, Москва

²Кафедра общей биологии и генетики, медицинский институт РУДН, Россия, Москва

³Лаборатория генетики развития мозга НИИ "Нейронаук" ННГУ им. Лобачевского, Россия, Нижний Новгород

Введение. Дисфункция гена *UBE2A* вызывает патологии развития ЦНС, выражающиеся в X-сцепленном синдроме умственной отсталости по типу Насименто. Белок *UBE2A* участвует в регуляции транскрипции, митофагии и репарации ДНК, но его роль в нейрогенезе не изучена. Ранее в нашей лаборатории выявлено в нейральных предшественниках, дифференцированных из ИПСК с нокаутом *UBE2A*, снижение экспрессии генов RHO/ROCK пути, регулирующего цитоскелет. Цель исследования — функциональная валидация этих данных через изучение влияния нокаута *Ube2a* на подвижность и морфологию нейронов при кортикогенезе у мышей.

Методы. Генно-инженерными методами созданы плазмиды pX330(GFP-) и pX458(GFP+) с гидовой РНК, комплементарной 3-му экзону гена *Ube2a* мыши. Эффективность редактирования оценивали после электропорации фибробластов 3Т3 плазмидой pX458, сортировки GFP+ клеток, ПЦР амплификации фрагментов ДНК с участком редактирования и секвенирования по Сэнгеру. Плазмиду pX330, а также плазмиды, кодирующие eGFP и Venus, применяли для *in utero* электропорации мозга эмбрионов мыши на 13-й день гестации. Эмбрионы извлекали на 15, 16, 18-й день, генотипировали по полу с помощью ПЦР, фиксировали мозг, готовили криосрезы и проводили иммуногистохимическое окрашивание антителами к GFP и PCNA. Изображения срезов получали методом конфокальной микроскопии.

Результаты. Проведена экспериментальная оценка гидовых РНК для редактирования гена *Ube2a* мыши, выбрана гидовая РНК с максимальной эффективностью редактирования (94%) в клетках линии 3Т3. Разработан и оптимизирован дизайн ПЦР с праймерами к генам *Sry* и *Sox2* для генотипирования тканей мыши по полу, методика валидирована на тканях взрослых самцов и самок. Проведён морфометрический анализ мигрирующих нейронов кортекса эмбрионов самцов мыши после CRISPR-Cas9 нокаута *Ube2a*.

Выводы. Создана платформа для изучения влияния нокаута гена *Ube2a* на подвижность и морфологию нейронов в процессе эмбрионального кортикогенеза мыши.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 21-65-00017

МБ21. Влияние N–концевого якорного домена белка хвостовых шипов на свойства синтетических бактериофагов, поражающих *Klebsiella pneumoniae*

Е.Е. Михайлова (e.mikhailova2@g.nsu.ru)^{1,2}, И.К. Байков^{1,2}, О.М. Курченко²

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

²Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

Введение. Распространение антибиотикорезистентных бактерий требует поиска альтернативных методов борьбы с патогенными микроорганизмами. Один из вариантов – фаготерапия – лечение с использованием бактериальных вирусов (бактериофагов). Возможности данного подхода можно расширить, конструируя синтетические фаги на базе природных вариантов. Методы генетической инженерии позволяют вносить модификации в геномы фагов для изменения их свойств. Однако, бактериальные вирусы – сложно организованные объекты, поэтому для разработки четких стратегий по созданию синтетических бактериофагов необходимо накопление знаний о деталях организации и функционирования фаговых белков. В частности, в ходе данного исследования изучали влияние N-концевого участка белка хвостовых шипов на эффективность размножения синтетических фагов, поражающих *K. pneumoniae*.

Методы. ПЦР, TAR-клонирование, «перезапуск» фаговых геномов с помощью трансформации *E. coli*, оценка эффективности адсорбции и эффективности репликации бактериофагов на разных штаммах *K. pneumoniae*, 3D-моделирование пространственных структур белков (AlphaFold и UCSF Chimera).

Результаты. На основе сконструированных геномов были получены синтетические бактериофаги, свойства которых исследовали на разных штаммах *K. pneumoniae*. Во-первых, установлено, что N-концевая часть белка хвостовых шипов влияет на эффективность адсорбции и эффективность репликации бактериофага на том или ином штамме бактерий. Следовательно, при выборе генов белков хвостовых шипов необходимо ориентироваться не только на С-концевую часть белка, отвечающую за распознавание и деградацию бактериальной капсулы, но и на N-концевой домен. Во-вторых, обнаружено, что фаги с одинаковыми генами белков хвостовых шипов, но разными геномными «каркасами», реплицируются с разной эффективностью. Поэтому при дизайне синтетических фагов необходим подбор подходящего геномного «каркаса» фага-реципиента.

Выводы. Создание синтетических фагов с предсказуемыми свойствами требует учета множества факторов, в частности, выбора подходящих N-концевого и С-концевого доменов белков хвостовых шипов, а также геномного «каркаса» будущего фага.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-24-00553

МБ22. Регуляция сумоилирования TRIM28 белком Kaiso: роль ВТВ домена и поиск новых модуляторов среди семейства ВТВ/POZ

В.К. Морозова (leraholod448@gmail.com)¹, Я.В. Лобанова^{2,3}, С.В. Женило^{2,3}

¹*ПМГМУ им. И.М. Сеченова, Россия, Москва*

²*Лаборатория геномики и эпигеномики позвоночных, ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва*

³*Институт Биологии Гена РАН, Россия, Москва*

Введение. TRIM28 является транскрипционным корепрессором. KRAB-белки привлекают TRIM28 к генам-мишеням, где усиливают его сумоилирование, за счет чего TRIM28 рекрутирует гистоновые деацетилазы и метилтрансферазы. Метил-ДНК-связывающий белок Kaiso (ZBTB33), относящийся к семейству ВТВ/POZ белков, также способен усиливать сумоилирование TRIM28, однако механизмы этого взаимодействия остаются неизученными. Также остается открытым вопрос, могут ли другие белки, принадлежащие ВТВ/POZ семейству влиять на сумоилирование TRIM28.

Настоящая работа направлена на определение структурных особенностей взаимодействия Kaiso и TRIM28, лежащих в основе сумоилирования последнего, а также на выявление новых регуляторов сумоилирования TRIM28 среди ВТВ/POZ белков.

Методы. Для достижения поставленных целей были получены плазмидные конструкции, позволяющие экспрессировать различные домены Kaiso и TRIM28, включая мутантные формы Kaiso. Взаимодействие белков и уровень сумоилирования анализировали с помощью котрансфекции в клетках HEK293 с последующим вестерн-блоттингом. Для анализа структурного сходства ВТВ доменов использовалась программа Pairwise Structure Alignment (RSCB PDB).

Результаты. Показано, что для Kaiso-зависимого усиления сумоилирования необходима целостность TRIM28. Делеционный анализ выявил, что ВТВ/POZ домен Kaiso является достаточным для увеличения уровня сумоилирования TRIM28. Примечательно, что ближайший гомолог Kaiso, белок ZBTB4, не оказывает влияния на сумоилирование TRIM28. На основании структурного анализа были идентифицированы другие ВТВ/POZ белки, обладающие высокой степенью гомологии ВТВ домена с ВТВ доменом Kaiso.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о ключевой роли ВТВ домена Kaiso в регуляции сумоилирования TRIM28. Учитывая сходство между Kaiso и KRAB-белками в отношении TRIM28, можно предположить возможность использования данной системы для создания новых эпигенетических редакторов. В дальнейшем планируется масштабное исследование панели ВТВ-содержащих белков с целью выявления потенциальных регуляторов сумоилирования TRIM28.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 19-74-30026П.

МБ23. Влияние мутации G2019S в киназе LRRK2 на экспрессию компонентов внеклеточного матрикса и белков десмосомы в зрелых дофаминергических нейронах, дифференцированных из ИПСК

А.А. Мухина (alexandra.mukhinaa@gmail.com)^{1,2}, Е.А. Попик^{1,2}, А.В. Спасьникова², О.С. Лебедева²

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

²*ФГБУ ФНКЦ ФХМ ИМ. Ю.М. ЛОПУХИНА ФМБА РОССИИ, Россия, Москва*

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание, вызываемое гибелью дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции. Частой причиной наследственной формы БП является мутация G2019S в киназе LRRK2. Недавние исследования показали, что изменения во внеклеточном матриксе (ВКМ) нейронов могут влиять на развитие БП. Предварительно проведенный в нашей лаборатории транскриптомный анализ нейронов, дифференцированных из ИПСК, показал, что гены белков ВКМ (LUM, EFEMP1, COL23A1, COL2A1) и гены десмосом (DSC3, DSP) экспрессируются выше в клетках пациентов с БП, чем в клетках здоровых доноров. Целью нашей работы было оценить экспрессию выявленных генов и их белков в дофаминергических нейронах, полученных из изогенных ИПСК, отличающихся по наличию мутации G2019S в киназе LRRK2.

Методы. С помощью метода направленной дифференцировки изогенных линий ИПСК были получены зрелые дофаминергические нейроны вентрального среднего мозга. Экспрессию генов и их белков оценивали методами количественной ОТ-ПЦР и Вестерн-блоттинга, а также определяли локализацию белков при помощи иммуноцитохимического окрашивания.

Результаты. Иммуноцитохимическое окрашивание позволило визуализировать белки десмосомы и ВКМ и показать, что они действительно присутствуют в исследуемых образцах зрелых дофаминергических нейронов, дифференцированных из изогенных линий ИПСК. Локализация исследуемых белков соответствует данным литературы.

Данные по экспрессии в дофаминергических нейронах продуктов генов *LUM*, *EFEMP1*, *COL23A1*, *COL2A1*, *COL3A1*, *COL1A2*, *DSC3*, *DSP* на уровне мРНК и белка в зависимости от наличия мутации G2019S в киназе LRRK2 будут представлены на конференции.

Выводы. Полученные данные позволяют подтвердить, что внеклеточный матрикс участвует в нейродегенерации при болезни Паркинсона.

Данная работа поддержана грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования РФ.

МБ24. Роль внеклеточных везикул в индукции опухолевого фенотипа в модели гетерогенной опухоли рака предстательной железы

*А.Э. Некрасова (anastasianekrasova77289@gmail.com)¹, Д.М. Потанинкова¹,
А.А. Комиссаров², А.В. Творогова³*

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

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

³*Институт биологии гена Российской академии наук, Россия, Москва*

Введение. Рак предстательной железы (РПЖ) является наиболее распространенным злокачественным новообразованием у мужчин с уровнем летальности более 39% от всех случаев заболевания. Высокий уровень летальности объясняется недостаточным пониманием механизмов индукции опухолевого фенотипа в клетках предстательной железы (ПЖ). Было показано, что внеклеточные везикулы (EVs), выделяемые клетками первичной опухоли, являются мощными медиаторами образования пре-метастатической ниши, и, вероятно, могут индуцировать трансформацию нормальных клеток в мультифокальных раках, то есть изменение их фенотипа, миграторной активности и экспрессии основных биомаркерных генов, связанных с опухолевой трансформацией. Целью данного проекта является описание модельной линии агрессивного РПЖ – продуцента EVs, в стандартных и нестандартных условиях культивирования, а также ее сравнение с линией нормальных эпителиальных клеток ПЖ для создания модели сокультивирования.

Методы. В качестве клеток-продуцентов EVs была выбрана линия опухолевых клеток PC-3, в качестве модели нормальных клеток эпителия ПЖ – RWPE-1. Для создания модели сокультивирования и корректного анализа секреции EVs клетки PC-3 были переведены со стандартных условий культивирования – DMEM/F-12 с фетальной бычьей сывороткой – на бессывороточную среду AIM. Клетки были оценены по иммунофенотипу, экспрессии наиболее перспективных биомаркеров РПЖ, распределению по фазам клеточного цикла и морфологии. Паттерн продукции EVs клетками-продуцентами PC-3 был оценен с помощью NTA.

Результаты. Анализ выбранных характеристик не показал достоверных отличий при переводе клеток PC-3 на среду AIM. Описан паттерн продукции EVs клетками PC-3. Анализ морфологии и поверхностного иммунофенотипа клеток выявил достоверные отличия между клетками PC-3 и RWPE-1, культивируемыми на бессывороточной среде.

Выводы. Полученные результаты могут иметь ценность при разработке моделей сокультивирования нормальных и опухолевых клеток эпителия ПЖ.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В.Ломоносова. Работа А.А. Комиссарова выполнена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

МБ25. H2A.Z-содержащие нуклеосомы демонстрируют способность к образованию мультимолекулярного комплекса с p53 и PARP1

А.М. Новичкова (tonya.novichkova@bk.ru)¹, Д.О. Кошкина¹, Н.В. Малюченко¹, В.М. Студитский²

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

²*Онкологический центр Фокс Чейз, США, Филадельфия*

Введение. p53 и PARP1 являются ключевыми регуляторами, обеспечивающими сохранение геномной стабильности и участвующими в процессах, связанных канцерогенезом. Их взаимодействие реализуется как через прямой контакт, так и посредством поли(АДФ)-рибозилирования определённых участков p53. Изучение этих механизмов взаимодействия открывает перспективы для разработки новых подходов к терапии рака. Хроматин эукариотической клетки представляет собой сложный комплекс ДНК и белков, среди которых основную роль играют гистоны. Нуклеосомы, выступающие базовыми структурными единицами хроматина, могут включать как стандартные гистоны, синтезируемые преимущественно в S-фазе клеточного цикла, так и их варианты, которые обеспечивают более точную регуляцию взаимодействий с ДНК. Одним из таких вариантов является H2A.Z — гистон, который участвует в активации генов, репарации повреждений ДНК и поддержании геномной стабильности за счёт изменения структуры нуклеосом и доступности ДНК для белков.

Методы. В рамках данного исследования были использованы нуклеосомы, содержащие рекомбинантные человеческие гистоны с заменой канонический H2A на его вариантную форму H2A.Z. Для анализа взаимодействий применялся метод анализа электрофоретической мобильности в геле (гель-шифт) в нативных условиях.

Результаты. Полученные данные свидетельствуют о том, что нуклеосомы с H2A.Z обладают повышенной способностью к образованию тройного комплекса с белками p53 и PARP1.

Выводы. Это может указывать на пионерную функцию p53 и PARP1, усиленную вариантным гистон H2A.Z.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 19-74-30003.

МБ26. Изменение молекулярных механизмов в нормальных и опухолевых клетках под действием ингибитора сплайсинга пладиенолида Б

П.Р. Подлесный (podlesnyi.pr@phystech.edu)¹, М.М. Лукина¹, В.О. Шендер^{1,2}, Г.П. Арапиди^{1,2}

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

² ГНЦ ИБХ РАН, Россия, Москва

Введение. Изменение сплайсинга РНК характерно для многих типов злокачественных опухолей, поэтому активно изучают терапевтические агенты, нацеленные на компоненты сплайсосомы. Использование малых молекул — модуляторов сплайсинга, таких как пладиенолиды, представляется перспективным подходом, поскольку эти соединения обладают выраженной противоопухолевой цитотоксичностью. Изучение процессов, вызываемых в клетках модуляторами сплайсинга, важно для разработки эффективной противоопухолевой терапии.

Методы. Мы проанализировали транскриптомные профили клеток рака яичников SKOV3 через 24 и 48 часов после обработки ингибитором сплайсинга пладиенолидом Б (pl-B) в дозе 1,56 нМ, а также образцов опухолей и нормальных тканей кишечника мышей. Образцы тканей были получены через 18 и 24 часа после внутрибрюшинной инъекции pl-B (1 мг/кг).

Результаты. Биоинформатический анализ показал, что в клетках SKOV3, обработанных pl-B, наблюдается снижение экспрессии генов, участвующих в репарации ДНК, а также возникает множество событий альтернативного сплайсинга типа «пропуск экзона» и «удержание интрона». Функциональный анализ выявил, что гены с такими изменениями в сплайсинге также участвуют в репарации ДНК, пути нонсенс-опосредованного распада (NMD) и сплайсинге пре-мРНК. Похожие результаты были получены и на мышинной модели: pl-B привел к значительным изменениям в экспрессии генов и схожему паттерну альтернативного сплайсинга во всех экспериментальных группах, за исключением образцов нормальной ткани через 24 часа после инъекции pl-B, где эффект практически отсутствовал. Важно отметить, что пониженная экспрессия генов, связанных с NMD, а также нарушения в сплайсинге генов репарации ДНК были характерны только для опухолевых образцов. Данные *ex vivo* также показали, что эффект от pl-B длится непродолжительное время, при этом клетки нормальных тканей восстанавливаются быстрее опухолевых тканей.

Выводы. Мы исследовали индуцируемые pl-B изменения в клеточных процессах. Сопоставление результатов *in vitro* и *in vivo* выявило общий паттерн, связанный с дисрегуляцией на уровне экспрессии и сплайсинга генов, продукты которых участвуют в репарации ДНК, сплайсинге пре-мРНК и NMD. Мы предполагаем, что изменения в этих процессах могут обуславливать специфичность действия pl-B в отношении опухолевых клеток.

МБ27. Особенности доставки целевых белков в опухолевые клетки глиобластомы мыши и человека с помощью штамма LIVP IL-15

М.М Пуленова (pulenova.mm@phystech.edu)¹, В. Панфилова²

¹*Федеральный научно-клинический центр (ФНКЦ) ФМБА России, Россия, Москва*

²*Федеральный центр мозга и нейротехнологий» (ФЦМН) ФМБА России, Москва Россия*

Введение. Мультиформная глиобластома (GBM) является наиболее распространенной и злокачественной первичной опухолью головного мозга. Одним из вариантов терапии глиобластомы является онколитическая вирусотерапия (ОВ). Вирус осповакцины, показал многообещающие результаты, также вирусы в комплексе с иммунотерапией или химиотерапией дают более выраженный эффект. В предыдущих исследованиях были разработаны штаммы LIVP-IL15-RFP и LIVP-IL15Ra-RFP, которые продемонстрировали явные онколитические свойства в доклинических экспериментах (Липатова А.В., 2022). Интерлейкин-15 выбран как важный компонент иммунной системы, необходимый для активации и пролиферации натуральных киллеров и Т-клеток, что усиливает иммунный ответ и способствует выживанию эффекторных клеток. Целью данного исследования является обзор текущего состояния усовершенствований, достигнутых в онколитической терапии злокачественной опухоли мозга с апробацией на 3D модели культуры глиобластомы мыши и первичной культуры пациентов.

Методы. 1) Получение клеток первичной глиобластомы человека. 2) Формирование сфероидов. 3) Визуализация сфероидов с помощью системы визуализации Invitrogen EVOS M700 и конфокального микроскопа Nikon TM. 4) Обработка изображений NIS Elements AR. 5) Иммуноферментный анализ синтеза целевого белка в опухолевых клетках коммерческой тест-системой Invitrogen.

Результаты. Конфокальная микроскопия показала эффективное проникновение генно-инженерной конструкции в клетки сфероидов, что подтверждалось флуоресценцией tag-RFP. Также, в сфероидах, обработанных рекомбинантным штаммом LIVP-IL-15, наблюдалось явное снижение пролиферативной активности по сравнению с необработанными контролями. Отмечалось уменьшение жизнеспособности опухолевых клеток, что свидетельствует о потенциальном цитотоксическом эффекте конструкции.

Выводы. Полученные штаммы LIVP-IL15-RFP позволяют доставлять в опухолевые клетки целевые белки для поддержания иммунотерапевтических агентов в рамках комбинированной терапии.

Исследование финансировалось грантом РНФ 22-64-00057

МБ28. Поиск новых активаторов аутофагии среди бензоимидазопиримидинонов и исследование молекулярного механизма их действия

С.Я. Сокольская (*sofya.sokolskaya@yandex.ru*)¹, Е.А. Гусева², П.В. Сергеев², А.В. Аралов³

¹Факультет фундаментальной медицины МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт Физико-Химической биологии имени А.Н. Белозерского, Россия, Москва

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

Введение. Аутофагия – молекулярный процесс, служащий для удаления поврежденных компонентов клетки и строго регулирующийся через разветвленный молекулярный каскад. Подтипом аутофагии является митофагия, используемая для удаления поврежденных митохондрий. Нарушение этих процессов приводит к нейродегенеративным заболеваниям, а активация аутофагии способствует улучшению состояния при инфаркте миокарда, кардиомиопатии и атеросклерозе. Цель исследования - поиск активаторов аутофагии среди бензоимидазопиримидинонов и изучение механизма их действия.

Методы. Мы проводили первичный скрининг активности бензоимидазопиримидинонов на репортерной клеточной линии SH-SY5Y, экспрессирующей GFP-LC3 и RFP. Результаты валидировали при помощи иммуноблоттинга на LC3. Специфичность действия соединений изучали на клеточной линии с нокаутом AMPK. Для 5 молекул мы изучили статус фосфорилирования белков каскада регуляции аутофагии с помощью иммуноблоттинга. Внутриклеточную локализацию молекулы-лидера определяли флуоресцентной микроскопией при совместном окрашивании лизосом (Lysotracker) и митохондрий (MitoTracker). Способность активаторов аутофагии уменьшать количество белковых агрегатов внутри клетки оценивали на клеточной модели болезни Хантингтона.

Результаты. Мы выявили 5 соединений, активирующих ауто- и митофагию. Для лидерного соединения (AR625) мы показали, что оно ко-локализуется с митохондриями и лизосомами в клетке. Анализ механизма действия показал, что выбранные вещества преимущественно влияют на AMPK-зависимый путь активации, но не обладают специфичностью к AMPK. Обработка AR625 способствует специфичной деградации внутриклеточных белковых агрегатов.

Выводы. Мы выявили 5 новых активаторов аутофагии из группы бензоимидазопиримидинонов. Соединения индуцируют аутофагию по AMPK-зависимому пути, а также способствуют специфичной деградации внутриклеточных белковых агрегатов.

МБ29. Идентификация новых аутоантигенов при ревматоидном артрите

В.А. Стасова (vstasova28@gmail.com)^{1,2}, М.Ю. Захарова¹

¹Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Ревматоидный артрит (РА) – гетерогенное аутоиммунное заболевание, в основном проявляющееся как воспалительный процесс, развивающийся в синовиальной оболочке суставов. Одними из важных факторов риска развития заболевания являются некоторые аллели главного комплекса гистосовместимости II (МНС II), в частности аллели DRB1*01:01 и DRB1*04:01. Цель данной работы заключается в получении в рекомбинантной форме пяти предполагаемых аутоантигенных пептидов, которые ранее были идентифицированы у пациентов с ревматоидным артритом, а также в проведении анализа их связывания с DRB1*01:01 и DRB1*04:01 *in vitro* и исследования Т-клеточного ответа на связываемые пептиды.

Методы. Для создания генетических конструкций использовали такие методы, как полимеразная цепная реакция, рестрикционный анализ, лигирование. Проводилась экспрессия и очистка рекомбинантных пептидов и молекул МНС II. Анализ связывания рекомбинантных аутоантигенов с комплексами МНС II осуществлялся с использованием иммуоферментного анализа (ИФА). На данный момент проводим подготовку методов ELISPOT и тетрамеризованных МНС II в комплексе с изучаемыми пептидами для проверки Т-клеточного ответа на данные пептиды.

Результаты. Были наработаны 5 потенциальных аутоантигенов – фрагментов белков PARP1 (поли [АДФ-рибоза] полимеразы 1), TTHY (предшественник транстретина), CALR (предшественник калретикулина), AATM (предшественник 1 изоформы митохондриальной аспаратаминотрансферазы), GPAA1 (гликозилфосфатидилинозитол-заякоривающий белок 1) в слитной форме с белком-носителем бактериальным тиоредоксином. Проведена оценка связывания данных пептидов с рекомбинантными МНС II, аллели которых ассоциированы с ревматоидным артритом. В результате проведения ИФА в трех повторностях было показано, что фрагменты белков PARP1 и CALR связываются с DRB1*04:01, пептид AATM связывается с DRB1*01:01. Для пептидов TTHY и GPAA1 связывание с продуктами аллелей МНС II, ассоциированными с РА установлено не было.

Выводы. В ходе исследования выявлено, что фрагменты белков PARP1 и CALR связываются с аллелями МНС II DRB1*04:01, а пептид AATM – с DRB1*01:01, что может указывать на их потенциальную роль в патогенезе ревматоидного артрита. Фрагменты белков TTHY и GPAA1 не продемонстрировали связывания с аллелями МНС II, ассоциированными с ревматоидным артритом.

МБ30. Разработка молекул миРНК против консервативных участков генома РСВ.

П.А. Струева (polly.strueva@yandex.ru)^{1,2}, Е.Д. Тимотиевич¹, В.И. Ковчина¹, И. П. Шиловский¹

¹ ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Россия, Москва

² ФГАОУВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Россия, Москва

Введение. Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является частой причиной инфекционных заболеваний нижних дыхательных путей у детей, пожилых и лиц, страдающих бронхиальной астмой. Однако в России, эффективных и доступных методов лечения заболеваний, связанных с РСВ-инфекцией не разработано. Открытие механизма РНК-интерференции открыло новые возможности для создания противовирусных средств, обеспечивающих специфичное подавление репликации вируса. Известно, что ген *p* кодирует фермент - РНК-зависимую РНК полимеразу, а ген *n* - белок нуклеокапсида, поэтому введение в клетки соответствующей миРНК в экспериментах препятствовало бы репликации вирусной РНК. **Цель работы** заключалась в проектировании миРНК, направленных против данных генов РСВ, и изучение их противовирусных свойств *in vitro*.

Методы. Проектирование молекул миРНК осуществлялось *in silico* с использованием ПО OligoWalk. Противовирусная активность молекул миРНК оценивали путём трансфекции клеточной линии HEp-2 с использованием коммерческого реагента Lipofectamine 2000. Вирусную нагрузку оценивали с помощью количественной ПЦР и титрованием на монослое клеток МА-104.

Результаты. В результате биоинформатического анализа было спроектировано 43 варианта молекул миРНК, 4 наиболее перспективных были выбраны для оценки противовирусной активности *in vitro* на модели репликации РСВ. Наибольший противовирусный эффект обеспечивали варианты миРНК siN-745 и siP4, которые подавляли репликацию РСВ до 10 раз в сравнении с использованием контрольной миРНК – siGFP, что свидетельствует о сиквенс-специфическом подавлении репликации РСВ в клетке. Одновременное применение молекул миРНК siN-745 и siP4 обладало аддитивным эффектом - приводило к почти 100-кратному подавлению вирусной нагрузки в инфицированных клетках.

Выводы. Осуществлен дизайн и синтез молекул миРНК против генов *p* и *n*, жизненно важных для репликации РСВ, и показан аддитивный противовирусный эффект при их совместном использовании *in vitro*. Созданная композиция молекул миРНК может быть использована в составе противовирусных препаратов, направленных против РСВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №22-25-00182

МБ31. Влияние одонитевых разрывов ДНК на связывание белка PARP1 с нуклеосомами

А.В. Таран (alex03trn@gmail.com)¹, Н.С. Герасимова¹

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

Введение. Одонитевые разрывы являются одними из самых частых повреждений ДНК, приводящие к различным негативным последствиям для жизнедеятельности организма и влияющие на целостность его генома. В качестве белка-сенсора разрывов выступает поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1 (PARP1). Поврежденная ДНК может организовываться в нуклеосому, что может препятствовать связыванию PARP1 с одонитевым разрывом. Показано, что связывание PARP1 с нуклеосомной сердцевинной приводит к реорганизации нуклеосомной частицы, причем величина этой реорганизации зависит от локальной концентрации рассматриваемых белковых молекул. Однако исследований по влиянию белка PARP1 на структуру нуклеосомы с одонитевым разрывом нуклеосомной ДНК мало. Способность PARP1 детектировать разрывы и его участие в репарации ДНК играет важную роль в поддержании стабильности генома.

Методы. В исследовании были использованы одиночные флуоресцентно меченые нуклеосомы и очищенный рекомбинантный белок PARP1 человека. Для сборки нуклеосом методом ПЦР-амплификации получали фрагменты ДНК, включающие высокоаффинную к гистонам последовательность 603. Флуоресцентные метки были внесены в ДНК с составе затравочных олигонуклеотидов. Одонитевой разрыв вносили в ходе инкубации ДНК с никтурирующей эндонуклеазой. Сборку нуклеосом проводили методом диализа против растворов с понижающейся ионной силой в присутствии октамера рекомбинантных гистонов человека. Полученные нуклеосомы инкубировали с белком PARP1 в повышающейся концентрации, образование комплексов анализировали методом гель-электрофореза в нативных условиях и детектировали по флуоресцентному сигналу от ДНК.

Результаты. Анализ показал, что в обоих случаях - как в присутствии одонитевого разрыва в ДНК, так и в его отсутствие - после инкубации с белком PARP1 наблюдается снижение подвижности флуоресцентно меченых нуклеосом при электрофорезе в геле. Таким образом, обнаруживается эффективное образование комплексов нуклеосом с белком PARP1. При внесении одонитевого разрыва связывание наблюдается при меньших концентрациях белка, чем в случае неповрежденной ДНК.

Выводы. Было показано, что PARP1 человека эффективно связывается с нуклеосомами как интактными, так и с поврежденной ДНК. Внесение одонитевого разрыва в ДНК повышает эффективность связывания PARP1 с нуклеосомами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект 24-74-10012.

МБ32. Внесение генетических модификаций в культуру клеток свиней для создания животных для ксенотрансплантации органов

А.Р. Тархова (annatarhova49901@gmail.com)¹, А.А. Хабарова², Н.Р. Бамтулин^{1,2}, А.В. Смирнов²

¹Факультет естественных наук НГУ, Россия, Новосибирск

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. Перспективным источником донорских органов являются гуманизированные животные, например свиньи. Основная причина острого отторжения свиных органов у человека – отличие в гликозилировании клеток. Значительный вклад в него вносят углеводные производные α -Gal (ген *GGTA1*), Neu5Gc (ген *СМАН*) и SDa (гены *B4GALNT2*, *B4GALNT2L*). *GGTA1* и *СМАН* у человека являются псевдогенами, а *B4GALNT2* и *B4GALNT2L* имеют иной профиль экспрессии. Для получения гуманизированной свиньи необходимы ядра клеток, в которых данные гены будут работать аналогично человеческим, что достигается их нокаутом.

Методы. Для внесения генетических модификаций на первичной культуре эмбриональных фибробластов свиньи использовали систему CRISPR/Cas9. гРНК получали *in vitro* транскрипцией, матрица – продукт ПЦР с перекрывающимися концами. Критерием для отбора клеток с функциональным нокаутом *GGTA1* было отсутствие флуоресценции IsolectinB4-FITC (специфично связывающего α -Gal). Эффективность нокаута целевых генов оценивалась по результатам NGS как отношение прочтений с делециями и/или инсерциями к общему количеству прочтений. В ходе работы варьировались соотношения гРНК/Cas9, а также соотношения гРНК, специфичных к разным генам, с целью увеличения эффективности нокаута целевых генов.

Результаты. Эффективность нокаута генов в негативной по IsoB4-FITC популяции: 79.2 % для *GGTA1*, 15.2 % для *СМАН*, 16.8 % – *B4GALNT2*, 2.3 % – *B4GALNT2L*. Эффективность нокаута в суммарной популяции клеток для *GGTA1* – 18.3 %, *СМАН* – 9.9 %, *B4GALNT2* – 0.7 %, *B4GALNT2L* – 0.4 %. Одновременный нокаут 4 целевых генов в каждой клетке происходит с эффективностью 9.5-10%. Одновременный нокаут *GGTA1* и *СМАН* для соотношения Cas9/гРНК 1 к 1 составил 52%, а для 1 к 2 – 80%.

Выводы. Отбор клеток по отсутствию α -Gal увеличил эффективность нокаута *GGTA1* с 18% до 79%, для остальных генов аналогично. Эффективность одновременного нокаута целевых генов в клетке – 9.5-10%. Для одновременного нокаута *СМАН* и *GGTA1* более эффективным оказалось использование соотношения Cas9/гРНК 1 к 2.

МБ33. Реинициация и протекающее сканирование в механизме устойчивой трансляции мРНК ATF5 к клеточным стрессам

Р.С. Тумбинский (*tu_roman2018@mail.ru*)

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Россия, Москва

Введение. ATF5 – транскрипционный фактор, участвующий в стрессовом ответе и дифференцировке. В условиях хронического стресса ATF5 связан с развитием онкологических заболеваний. Считается, что устойчивость трансляции мРНК ATF5 к фосфорилированию eIF2 обеспечивается преимущественной реинициацией рибосом с короткой 5' проксимальной рамки на основной рамке. Данная работа демонстрирует факты, противоречащие классическому объяснению устойчивой трансляции как результату реинициации и предлагает новые детерминанты, определяющие эффективную трансляцию мРНК к клеточным стрессам.

Методы. Молекулярное клонирование, транскрипция *in vitro*, мРНК трансфекция клеточных линий НЕК 293Т.

Результаты. Мутация старт-кодона 5' проксимальной рамки считывания сохраняет устойчивую трансляцию мРНК ATF5. Мутация в рамке, перекрывающейся с основной, приводит к утрате всякой устойчивости. Укорочение области перекрывания uORF и основной рамки приводит к снижению, а нарушение перекрывания полностью лишает мРНК устойчивой трансляции. Вводя перекрывания двух рамок на исходно неустойчивых мРНК можно добиться приобретения ими трансляционной устойчивости. При элиминации только реинициации, либо только протекающего сканирования, сохраняется устойчивость основной рамки. Таким образом, и протекающие рибосомы и реиницирующие вносят вклад в устойчивую трансляцию рамок мРНК ATF5.

Выводы. 1. Устойчивая трансляция мРНК ATF4 и ATF5 сохраняется при делеции 5' проксимальной uORF в условиях окислительного стресса и стресса эндоплазматического ретикулума. 2. Трансляция uORF2, мРНК ATF5 демонстрирует устойчивость при сохранении перекрывающейся с ней основной рамки. 3. Устойчивая к фосфорилированию eIF2 трансляция мРНК ATF5 требует наличия перекрывания между uORF и основной рамками. 4. Перекрывание рамок считывания неспецифически обеспечивает устойчивую трансляцию мРНК. 5. Протекающие рибосомы, также как и реиницирующие обеспечивают устойчивую трансляцию основной рамки мРНК ATF5.

МБ34. Анализ внутриклеточной локализации миозина 1С в интерфазных и митотических клетках рака предстательной железы человека

*М.С. Фомина (mariiaf1906@gmail.com)¹, А.В. Ковалева¹, И.А. Воробьев¹,
А.А. Саидова²*

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

²*Биологический факультет МГУ-ППИ, Китайская Народная Республика, Шэньчжэнь*

Введение. Миозин 1С относится к неклассическим мономерным миозинам I класса. В цитоплазме миозин 1С участвует в модуляции натяжения мембраны, удержании и секреции везикул, внутриклеточном транспорте и позиционировании веретена деления. В ядре – в регуляции транскрипции генов и ремоделирования хроматина. Также ряд исследований указывает на его участие в процессах прогрессии различных опухолей, включая рак предстательной железы. Детальное исследование локализации миозина 1С на разных стадиях клеточного цикла представляет собой важную задачу для дальнейшего исследования его функций в нормальных и опухолевых клетках.

Методы. В работе использовалась клеточная линия РС-3 (рак предстательной железы). Из 10 протоколов мы выбрали наиболее оптимальный. Клетки фиксировали 2% ПФА в ФСБ, $T_{\text{комн}}$ 15 минут, пермеабилizировали ледяным метанолом (-20°C , 15 минут). Неспецифическое связывание блокировали 3% БСА, $T_{\text{комн}}$ 30 минут. Миозин 1С окрашивали первичными антителами sc-136544 (1:200), $+4^{\circ}\text{C}$ в ночь, и вторичными антителами ab150117 (1:200), $T_{\text{комн}}$ 30 минут. Изображения получали на конфокальном микроскопе Zeiss LSM900 при содействии Программы развития МГУ.

Результаты. Количественный анализ паттернов распределения миозина 1С в интерфазных клетках РС-3 показал, что его интенсивность флуоресценции (ИФ_{myo1c}) на вентральной стороне клетки остается близкой к фоновой по всей площади. На уровне $0,4 \pm 0,2$ мкм от основания клетки в активной ламелле ИФ_{myo1c} не различается между зонами с рафлами и без них. Но на неактивном краю ИФ_{myo1c} увеличивается в 2–3 раза по сравнению со средним значением для тела клетки. На высоте $1 \pm 0,2$ мкм в области рафлов также возрастает ИФ_{myo1c} в 2–3 раза. В митотических клетках РС-3 на всех стадиях от прометафазы до поздней телофазы миозин 1С преимущественно локализован на плазматической мембране, где ИФ_{myo1c} возрастает в 1,5–2 раза по сравнению со средним значением для тела клетки.

Выводы. В клетках рака предстательной железы человека миозин 1С преимущественно локализован на активном краю в местах рафлов и на неактивном краю на не связанной с субстратом плазматической мембране в интерфазе и на всей плазматической мембране, не связанной с субстратом, в митозе. Проведенный анализ паттернов внутриклеточного распределения миозина 1С позволил не только подтвердить ряд данных литературы на количественном уровне, но и описать новые области локализации данного белка.

МБ35. Kaiso—зависимое сумоилирование: поиск и характеристика новых мишеней

А.К. Цветкова (tsvetkova.ankon@gmail.com)¹, Я.В. Лобанова², Е.Б. Прохорчук², С.В. Женило²

¹*Сеченовский Университет, Россия, Москва*

²*Институт биоинженери им. К.Г. Скрябина ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва*

Введение. Сумоилирование — это посттрансляционная модификация, при которой к лизинам белков-мишеней ковалентно присоединяется SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier). Этот процесс влияет на активность белков-мишеней, а также на их взаимодействие с другими факторами. Присоединение SUMO обусловлено белковым каскадом, что предполагает слаженную работу E1-активирующих, E2-конъюгирующего ферментов и E3-лигаз. Изменение активности или уровня экспрессии E3 позволяет варьировать сумоилирование белков-мишеней, влияя на их функциональность.

Транскрипционный фактор Kaiso, обладающий SIM (SUMO interacting motif) последовательностями, характерными для E3 SUMO лигаз, ранее был идентифицирован как регулятор сумоилирования TRIM28. С целью выявления новых мишеней Kaiso в регуляции сумоилирования в настоящей работе был проведен поиск белков, сумоилирование которых зависит от присутствия Kaiso.

Методы. Для идентификации потенциальных мишеней была использована модельная система клеточной линии HEK293, стабильно экспрессирующая SUMO2-10xHis, и HEK293, нокаутная по гену Kaiso. После выделения сумоилированных белков из обеих клеточных линий после теплового шока был проведен масс-спектрометрический анализ. Для подтверждения полученных результатов была получена кДНК идентифицированных белков, клонирована в экспрессионный вектор pCDNA3-Мус и проведена котрансфекция с последующим анализом уровня их сумоилирования в зависимости от присутствия Kaiso в условиях теплового шока.

Результаты. Результаты масс-спектрометрического анализа показали, что белок ZKSCAN8 присутствует в сумоилированной форме в клетках дикого типа, в то время как в Kaiso-нокаутных клетках сумоилированная форма ZKSCAN8 не детектируется при тепловом шоке. Котрансфекция с использованием вектора, экспрессирующего ZKSCAN8, подтвердила необходимость Kaiso для сумоилирования ZKSCAN8 в условиях теплового шока.

Выводы. Белок ZKSCAN8 впервые идентифицирован как новая мишень сумоилирования белка Kaiso. Наши дальнейшие исследования будут направлены на выяснение молекулярных механизмов и функциональной значимости сумоилирования ZKSCAN8 под действием Kaiso, включая определение сайтов сумоилирования и влияния модификации на функцию ZKSCAN8.

МБ36. Изменения транскриптома опухоли GL261 при инфекции онколитическим вирусом VV-GMCSF-Lact и инъекциях GM-CSF человека и мыши

А.С. Чеснокова (a.chesnokova@g.nsu.ru)^{1,2}, Н.С. Васильева¹, Е.В. Кузигина¹, Д.В. Семенов¹

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

²*Факультет естественных наук НГУ, Россия, Новосибирск*

Введение. Глиомы – наиболее распространённые первичные опухоли головного мозга с низкой медианой выживаемости пациентов. Ранее был создан штамм вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, несущий гены человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и лактапина. VV-GMCSF-Lact обладает выраженной цитотоксической активностью против клеток глиобластомы. Целью исследования является анализ изменений экспрессии генов в трансплантированных мышам опухолях глиомы GL261 после лечения вирусом VV-GMCSF-Lact или GM-CSF.

Методы. Клетки глиомы GL261 трансплантировали мышам C57Bl/6 и вводили VV-GMCSF-Lact или GM-CSF. После завершения терапии проводили полнотранскриптомный анализ РНК опухолей, анализ дифференциальной экспрессии генов, а также анализ обогащения по функциональной принадлежности генов в среде R.

Результаты. Инфекция VV-GMCSF-Lact активирует провоспалительные транскрипционные факторы (ТФ) (NFKB1, STAT1, СЕВРА), врождённый иммунный ответ, а также повышает экспрессию хемокинов (CXCL1, -2, -5) и интерлейкинов (IL6, IL10), подавляя ТФ SOX2, TP53 и гены эпителиально-мезенхимального перехода (EMT). Инъекции GM-CSF человека активируют ТФ E2F, MYC/MAX, повышают экспрессию генов (BUB1, MKI67) и подавляют экспрессию генов врождённого иммунного ответа. GM-CSF мыши подавляет экспрессию генов белков рибосом и ферментов окислительного фосфорилирования.

Выводы. VV-GMCSF-Lact активирует провоспалительные ТФ, TLR-сигналинг и хемотаксис нейтрофилов, а также подавляет SOX2, TP53, SUZ12, снижая экспрессию генов EMT и Wnt-сигналинга. GM-CSF человека стимулирует митотические процессы (E2F, MYC/MAX, SMAD4) и mTORC1-сигналинг, но подавляет экспрессию генов врождённого иммунного ответа.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-14-00390. Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 125012900932-4 (<https://rscf.ru/project/24-14-00390/>).

МБ37. Цитотоксическое действие нитрозильных комплексов железа на клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека

Г.А. Числов (*grisha.chislov.9999@gmail.com*)¹, А.А. Терехова², А.С. Конюхова², Т.С. Стыпина²

¹Факультет естественных наук ГУП, Россия, Москва

²ФИЦ «Проблем химической физики и медицинской химии РАН» Россия, Московская область, Черноголовка

Введение. Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) – злокачественное новообразование, обладающее высокой устойчивостью к большинству методов лечения, что приводит к неблагоприятному прогнозу. Известно, что оксида азота (NO) в микромолярных концентрациях обладает противоопухолевыми свойствами, которые трудно получить в опухолевых клетках, если не использовать экзогенные доноры NO. К классу спонтанных доноров NO относятся нитрозильные комплексы железа (НКЖ), которые могут стать перспективными препаратами как для монотерапии опухолей, так и для применения с известными цитокстатиками.

Методы. В работе исследовали цитотоксическое действие нитрозильных комплексов железа с лигандами ряда бензолметантиола (НКЖ **1** с 4-метоксибензолметантиолом и НКЖ **2** с 4-хлорбензолметантиолом) на клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 *in vitro*. В качестве модели нормальных клеток использовали клетки Vero. Использовали методы МТТ-теста, оценки внутриклеточного NO, проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Анализ цитотоксического действия показал, что комплекс НКЖ **1** более токсичен для клеток HepG2, чем НКЖ **2**. Для клеток Vero доза IC50 для исследуемых НКЖ более чем в 3 раза выше, чем комплексов, что может говорить о специфической токсичности комплексов для клеток HepG2. Обнаружено, что НКЖ **1** вызывает увеличение NO в клетках HepG2 в 1,5 раза через 5 минут после внесения комплекса, а НКЖ **2** – в 2,5 раза. Обнаружено, что НКЖ **1** вызывает остановку клеточного цикла клеток HepG2 в фазе S клеточного цикла и снижение содержания клеток в G2/М. НКЖ **2** вызывает остановку в фазе G1 клеточного цикла. Исследуемые НКЖ не вызывают накопление клеток в области гистограммы SubG1, где регистрируются мертвые клетки, что свидетельствует о том, что НКЖ не вызывают гибель клеток HepG2.

Выводы. В результате исследования обнаружено, что исследуемые НКЖ проявляют токсическое действие на клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека. Обнаружено, что НКЖ вызывают увеличение внутриклеточного оксида азота в клетках HepG2 и остановку клеточного цикла.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (госзадание № 124020500019-2).

МБ38. Оценка влияния мутации с.7416_7418delGAA в гене филамина С (FLNC), ассоциированной с развитием рестриктивной кардиомиопатии, на протеостаз кардиомиоцитов

М.Ю. Шарикова (*sharikova.marg@yandex.ru*)¹, Д.В. Голуцова¹, О.С. Лебедева¹, А.Н. Богомазова¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Россия, Москва

Введение. Рестриктивная кардиомиопатия (РКМП) - орфанная патология миокарда, часто связанная с миссенс-мутациями в гене филамина С (*FLNC*), потенциально вызывающими агрегацию филамина С и нарушение протеостаза кардиомиоцитов. Удобной моделью РКМП являются пациент-специфичные кардиомиоциты, дифференцированные из ИПСК (ИПСК-КМ). Целью исследования была оценка влияния мутации с.7416_7418delGAA в гене *FLNC* на протеостаз ИПСК-КМ после ингибирования протеасом относительно условий без воздействия в пациент-специфичной клеточной модели РКМП. Для более достоверного воспроизведения фенотипа патологии *in vitro* мы провели созревание ИПСК-КМ.

Методы. В работе были использованы ИПСК дикого типа и ИПСК пациента с гетерозиготной мутацией с.7416_7418delGAA в *FLNC* и диагнозом РКМП. Основные методы анализа - RT-qPCR и ИЦХ окрашивание.

Результаты. Анализ содержания изоформ тропонина И в полученных ИПСК-КМ показал, что культуры содержали преимущественно фетальные (ssTnI⁺), но также и зрелые (сTnI⁺) кардиомиоциты. Мы детектировали ожидаемое повышение экспрессии *BAG3*, опосредующего деградацию дефектного филамина С, после ингибирования протеасом во всех ИПСК-КМ. Мы неожиданно обнаружили повышение экспрессии *FLNC* в здоровых, но не в мутантных, ИПСК-КМ после ингибирования протеасом, что может говорить о нарушении компенсаторной экспрессии *FLNC* при повышении нагрузки на систему аутофагии в кардиомиоцитах пациента. По результатам ИЦХ окрашивания мы детектировали *BAG3* и *FLNC* во всех культурах и не наблюдали явной агрегации филамина С в клетках пациента. В дальнейшем мы планируем провести полуколичественный анализ содержания *BAG3* и *FLNC* методом вестерн-блоттинга ввиду трудности окрашивания саркомерных антигенов в ИПСК-КМ.

Выводы. Использованный протокол дифференцировки позволил получить клеточную модель РКМП, содержащую фетальные и зрелые кардиомиоциты. Мутация с.7416_7418delGAA, вероятно, приводит к нарушению компенсаторной экспрессии *FLNC* в кардиомиоцитах при увеличении нагрузки на систему аутофагии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-25-00456.

МБ39. Рецептор NKG2D играет ключевую роль в НК-клеточном ответе на фибробластоподобные производные ИПСК

Д.К. Шерман (*dar.sher.man0@gmail.com*)^{1,2}, М.Е. Богомякова²

¹Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

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

Введение. Персонализированная терапия с использованием производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациента предполагает отсутствие иммунного отторжения и необходимости иммуносупрессии. Однако полная иммунная толерантность к таким клеткам остается под вопросом. Нами ранее было показано, что фибробластоподобные производные ИПСК (iPS-fibro) чувствительны к цитотоксической активности аутологичных NK-клеток из-за повышенной экспрессии активирующих лигандов (MICA, PVR, NECTIN2). Целью данной работы является получение iPS-fibro с нокаутом генов активирующих лигандов *NECTIN2*, *PVR*, *MICA* и определение наиболее значимого из них в НК-клеточном ответе.

Методы. На первом этапе работы ИПСК здоровых доноров дифференцировали в iPS-fibro через стадию эмбрионидных телец. Используя метод геномного CRISPR-Cas9 редактирования и сортировки негативной популяции по гену интереса, получали iPS-fibro с нокаутом генов *NECTIN2*, *PVR* и *MICA*. Иммунный ответ NK-клеток, выделенных из крови здоровых доноров, оценивали по уровню экспрессии маркера дегрануляции – CD107a (LAMP-1).

Результаты. Применение блокирующих антител против рецептора NKG2D значительно снижало иммунный ответ аллогенных и аутологичных NK-клеток на iPS-fibro. Однако нокаут гена *MICA*, кодирующий основной лиганд рецептора NKG2D, не оказывал существенного влияния на реакцию NK-клеток у большинства доноров. Блокировка рецептора DNAM-1 также не снижала дегрануляцию NK-клеток, что подтверждается отсутствием выраженного эффекта при нокауте генов *NECTIN2* и *PVR*. Интересно, что нокаут *NECTIN2* усиливал иммунный ответ NK-клеток большинства доноров, что указывает на ингибирующую роль этого лиганда в данном типе клеток.

Выводы. Рецептор NKG2D, в отличие от рецептора DNAM-1, играет ключевую роль в активации цитотоксической программы против iPS-fibro. В то же время, нокаут гена важнейшего лиганда этого рецептора (*MICA*) не является достаточным для снижения иммунного ответа NK-клеток.

Работа поддержана грантом РНФ №24-65-00044

Литература

1. Bogomiakova, M.E. et al. (2023) iPSC-derived cells lack immune tolerance to autologous NK-cells due to imbalance in ligands for activating and inhibitory NK-cell receptors. *Stem Cell Res Ther*,14(1),77.

МБ40. Роль линкерного гистона H1 в регуляции активности ферментов поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 и 2

Д.М. Штанов (d.shtanov@g.nsu.ru)^{1,2}, Т.А. Кургина², Н.А. Моор², О.И. Лаврик²

¹*Факультет естественных наук НГУ, Россия, Новосибирск*

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

Введение. Поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 и 2 (PARP1/2) — ядерные ферменты, катализирующие синтез поли(АДФ-рибозы) (PAR), ковалентно связанной с аминокислотными остатками белков. Ферменты регулируют многие клеточные процессы, включая репарацию ДНК. В терапии ряда онкологических заболеваний применяются ингибиторы ферментов PARP. Причиной развития устойчивости опухолей к ингибиторам PARP и побочных эффектов может быть модуляция активности PARP1/2 белками-партнёрами. А изучение такой модуляции — актуальная научная задача.

Методы. Полимеразная цепная реакция, хроматографическое выделение белков, электрофоретический анализ белков и нуклеиновых кислот, флуоресцентная спектроскопия.

Результаты. С помощью измерения анизотропии флуоресценции были определены величины EC50 комплексов PARP1/2 и гистона H1 с модельными ДНК и нуклеосомами (NCP), в том числе содержащими одонуклеотидную брешь. Гистон H1 стимулирует диссоциацию PARP1 и PARP2 из комплексов с ДНК/NCP в процессе PAR-илирования. Фактор PAR-илирования гистонов 1 (HPF1) способствует стимуляции диссоциации. Анализ продуктов реакции PAR-илирования показал, что H1 стимулирует синтез PAR ферментом PARP2 в узком диапазоне концентраций. В присутствии гистона H1 происходит ускорение синтеза PAR ферментом PARP2. Но избыток H1 подавляет PAR-илирование. Гистон H1 — мишень HPF1-зависимого PAR-илирования даже в отсутствие ДНК. Наличие H1 приводит к увеличению числа точек инициации PAR-илирования.

Выводы. Линкерный гистон H1 конкурирует с PARP1/2 за связывание с ДНК и NCP. Эта конкуренция стимулирует диссоциацию ферментов PARP1/2 из комплексов с ДНК и NCP в процессе PAR-илирования, а также подавляет синтез PAR при избытке H1. Гистон H1 стимулирует синтез PAR в узком диапазоне концентраций. Эта стимуляция происходит за счёт увеличения количества событий инициации PAR-илирования, а также благодаря увеличению скорости реакции PAR-илирования. Гистон H1 подвергается PAR-илированию в отсутствие ДНК-активаторов и в присутствии HPF1, что свидетельствует об образовании комплекса PARP2•HPF1•H1. Таким образом, H1 модулирует реакцию PAR-илирования, катализируемую PARP1 и PARP2.

Работа была выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-74-10059.

МБ41. Аберрантная экспрессия группы генов системы апоптоза при раке почки

Я.А. Якубенко (yana.frr@gmail.com)¹, И.Ю. Лялина¹, И.В. Пронина^{1,2}

¹ *ФГАОУ ВО «Государственный университет просвещения», Россия, Москва*

² *ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Россия, Москва*

Введение. Рак почки составляет около 3% в структуре онкологической заболеваемости среди женщин и 5% среди мужчин, представляя собой серьезную угрозу для здоровья населения. Экспрессия генов апоптоза при раке почки относится к уровню активности и количеству белков, которые контролируют процесс программируемой клеточной смерти (апоптоза) в раковых клетках. Цель исследования - оценить изменение уровней экспрессии ряда генов системы апоптоза (BCL2, BAX, BIM, DAPK1, MCL1 и TP53) в клетках рака почки по сравнению с экспрессией этих генов в прилежащей гистологически нормальной ткани почки.

Методы. В работе использовались 45 парных образцов РНК выделенных из опухолевых и нормальных тканей почки. Определили концентрацию тотальной РНК на приборе NanoDrop1000, сохранность РНК определили методом электрофореза с последующей визуализацией на Gel Doc XR Bio-Rad и оценкой в программе Image Lab Bio-Rad. Оценку уровня экспрессии исследуемых генов провели методом обратной транскрипции с последующей Real-time ПЦР на приборе CFX 96 Bio-Rad, результаты анализировали в программе CFX Maestro 2.0 Bio-Rad. Статистическую обработку результатов проводили методом ANOVA после оценки нормальности распределения в тесте Шапиро-Уилка. В качестве референсных генов использовали B2M и ACTB.

Результаты. Экспрессия генов BAX, BIM, DAPK1, MCL1 и TP53 снизилась в 1,58-2,63 раза по медиане ($p \leq 0,05$). Для гена BCL2 не было показано значимое изменение экспрессии. Хотя система белков BCL2/BAX считается одной из главных регулирующих апоптоз систем клетки, при раке почки, вероятно, задействован клеточный путь апоптоза. Регуляция клеточного пути апоптоза осуществляется продуктами экспрессии генов DAPK1 и TP53. По результатам нашей работы экспрессия генов DAPK1 и TP53 нарушена при раке почки в наибольшей степени.

Выводы. Изучение экспрессии генов апоптоза имеет важное значение для понимания механизма канцерогенеза и разработки новых подходов к терапии рака. Например, таргетная терапия, направленная на восстановление нормального баланса между про- и анти-апоптотическими механизмами, может повысить эффективность лечения рака.

МБ42. Разработка репортерной системы для детекции G-квадруплексных структур в промоторной области гена TERT человека

Ю.В. Якушкина (ddddd80486@gmail.com)¹, М.В. Монахова²

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

²НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Теломеразный комплекс, каталитическим компонентом которого является обратная транскриптаза (hTERT), отвечает за поддержание длины теломер, определяющих пролиферативный потенциал клетки. Повышенная экспрессия гена *hTERT* в соматических клетках наблюдается в 85% случаев онкологических заболеваний. Считается, что причиной активации гена *hTERT* при онкогенезе является возникновение единичных замен C228T и C250T в промоторе hTERT. Ранее в промоторной области *hTERT* показано формирование 3 tandemных параллельных G-квадруплексов (G4). Возникающая замена G>A дестабилизирует G4-структуру, тем самым делая последовательность более доступной, что приводит к реактивации активности теломеразы. Так, стабилизацию G4-структуры в промоторе можно рассматривать как возможный путь снижения экспрессии *hTERT* и роста опухоли.

Методы. В работе получены репортёрные конструкции на основе плазмиды pRFPCER, содержащей гены двух флуоресцентных белков — RFP и Cerulean и последовательность центрального G4 промоторной области *hTERT* перед геном Cerulean. Вставка содержала замены C228T, C250T или C228T+C250T, либо была нативного строения. Наличие G4 в плазмидной конструкции подтвердили методом «остановки» полимеразы. Стабильность G4 фиксировали по относительной флуоресценции Cerulean/RFP клеток *E. coli* штамма BW25113 ($\Delta tolC$).

Результаты. Получены репортёрные конструкции на основе флуоресцентных белков Cerulean и RFP для изучения влияния G4 на синтез белка. Доказано образование G4 в плазмидных конструкциях. Установлено, что уровень относительной флуоресценции Cerulean/RFP клеток *E. coli*, содержащих репортёрные конструкции, коррелирует со стабильностью G4, находящегося во вставке, — чем стабильнее G4, тем меньшая относительная флуоресценция наблюдается. Продемонстрировано влияние G4-стабилизирующих лигандов BRACO19, TMPyP4, PhenDC3 на синтез репортёрного белка. Относительная флуоресценция клеток, содержащих репортёрные конструкции, уменьшается с возрастанием концентрации лигандов.

Выводы. Получены репортёрные конструкции на основе генов флуоресцентных белков Cerulean и RFP, содержащие G4-формирующую последовательность промоторной области гена hTERT. Продемонстрировано, что стабильность G4-структуры влияет на экспрессию репортёрного гена.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 25-24-00161.

*Секция: Физиология и
медицинская биохимия*



ФМ1. Участие ферментов синтеза и деградации анандамида, а также бета-аррестина-2 в регуляции секреции ацетилхолина в моторных синапсах мыши

Г.Ф. Абрарова (guzel.abrarova.sdo@yandex.ru)¹, Е.О. Тарасова¹

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

Введение. В настоящее время эндоканнабиноиды, в том числе арахидоноилэтаноламид (АЭА), или анандамид, представляют большой интерес для изучения. Оказалось, что экзогенный АЭА вызывает нетипичную для ЦНС потенциацию секреции медиатора в моторных синапсах. Для понимания работы АЭА в моторных синапсах было необходимо выявить его эндогенное действие, а также механизмы, по которым оно реализуется. В связи с этим, в данной работе изучали параметры синаптической передачи при ингибировании фермента синтеза (NAPE-PLD), а также фермента деградации (ФААН) АЭА, помимо этого исследовали эффекты анандамида у линии мышей, нокаутных по гену бета-аррестина-2.

Методы. Спонтанные миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) и вызванные электрической стимуляцией (50 Гц, 1 с) нерва потенциалы концевой пластинки (ПКП) регистрировались при помощи стандартной микроэлектродной техники в нервно-мышечных препаратах диафрагмы мыши.

Результаты. Ингибирование фермента синтеза АЭА при помощи ARN19874 (50 мкМ) не оказало влияния на параметры спонтанной и вызванной секреции ацетилхолина: частота и амплитуда МПКП, а также амплитуда ПКП не изменились. Возможно, использовалась недостаточная концентрация ARN19874, или же действие АЭА может не наблюдаться в связи с активной деградацией под действием ФААН.

При этом на фоне URB597 (1 мкМ), селективного ингибитора ФААН, повышается частота МПКП на 56% и амплитуда МПКП на 10%. Амплитуда ПКП также увеличивалась на фоне неизменного квантового состава. Соответственно, блокада деградации АЭА вызывает схожее действие, что и экзогенный АЭА, в виде прироста частоты МПКП. В это же время увеличивается и амплитуда МПКП, из-за чего отсутствует прирост квантового состава ПКП. В целом, механизмы действия АЭА нуждаются в более детальном изучении. У мышей, нокаутных по гену бета-аррестина-2, АЭА не повлиял на частоту МПКП, однако привел к увеличению амплитуды МПКП.

Выводы. Таким образом, можно заключить, что эндогенно вырабатываемый анандамид способен оказывать существенное действие на параметры спонтанной и вызванной синаптической передачи, что наблюдалось при использовании URB597, при этом важную роль в реализации эффектов анандамида играет бета-аррестин-2.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-25-00065.

ФМ2. Экспрессия микроглиального маркера Iba1 и состав микробиоты кишечника у крыс с контрастной возбудимостью нервной системы на поздних стадиях онтогенеза

С.А. Алексеева (sf240703@mail.ru)¹, С.П. Лузикова¹, И.Г. Шалагинова^{1,2}, Н.А. Дюжикова²

¹ОНК “Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)”, БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Стресс является критическим фактором в развитии ряда психических расстройств, но до сих пор не ясны механизмы его действия в долгосрочной перспективе. Стресс вызывает нейровоспаление, участие в котором принимает микроглия. Все больше данных указывает на то, что нарушения кишечной микробиоты могут способствовать развитию постстрессовых расстройств. В данном исследовании проведен сравнительный анализ экспрессии микроглиального маркера Iba1 в мозге и изменения в микробиоте кишечника у стареющих крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в норме и через 6 месяцев после стресса.

Методы. Экспериментальных животных подвергали длительному эмоционально-болевому стрессу по протоколу Гехта. Секвенирование состава микробиоты проводили на платформе Illumina Miseq. Перед декапитацией была проведена перфузия. Для иммуногистохимического исследования были использованы первичные антитела Iba1 и вторичные антитела Alexa Fluor 594. Были проанализированы области префронтальной коры, гиппокампа и миндалины. STCF был подсчитан с помощью программы ImageJ.

Результаты. Анализ α - и β -разнообразия микробиоты стула крыс с контрастной возбудимостью выявил значимые различия между группами. У крыс с высокой возбудимостью в микробиоте после перенесенного стресса ниже представленность бактерий рода *Blautia* и выше рода *Clostridia* по сравнению с контролем. У крыс с низкой возбудимостью, перенесших стресс, снижена представленность *Muribaculaceae* по сравнению с контролем. Уровень флуоресценции Iba1 не различался между группами, но показатели STCF имеют значимую положительную корреляцию с представленностью родов *Legionella*, *Ileibacterium*, *Desulfobacca*, *Porphyromonas*, *Ellin516* и некультивируемыми бактериями классов *Acidimicrobiia* и *Acidobacteriae*. Отрицательная корреляция обнаружена с родами *Alloprevotella*, *Bacteroides*, *Oscillospiraceae* и *Ruminococcaceae*.

Выводы. Стресс вызывает долгосрочные изменения в микробиоте кишечника крыс, при этом характер этих изменений специфичен для линий с контрастной возбудимостью нервной системы. Уровень флуоресценции Iba1 имеет значимые положительные и отрицательные корреляции с рядом бактериальных таксонов.

ФМЗ. Холестериновый конъюгат анти-П6 малой интерферирующей РНК предотвращает развитие ЛПС-индуцированного острого повреждения лёгких на мышинной модели

И.К. Бачкова (*i.bachkova@g.nsu.ru*)^{1,2}, А.В. Сенькова¹, И.А. Савин¹, Е.Л. Черноловская¹

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

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Введение. Способность малых интерферирующих РНК (siРНК) направленно подавлять генную экспрессию делает их перспективной альтернативой существующему лечению воспалительных заболеваний. В настоящее время применение siРНК в клинике ограничено заболеваниями печени, однако конъюгация с липофильными молекулами позволяет доставить siРНК в другие органы, включая лёгкие. Острое повреждение лёгких (ОПЛ) – тяжелое воспалительное заболевание с высокой смертностью и без специфического лечения. Интерлейкин-6 (П6) – один из ключевых медиаторов процессов воспаления, снижение его уровня ассоциировано с облегчением симптомов ОПЛ.

Методы. Клетки J774 трансфицировали анти-П6 siРНК, обрабатывали ЛПС, определяли уровень мРНК П6 с помощью RT-PCR. Мышам Balb/С интраназально вводили холестериновые конъюгаты siРНК и ЛПС, определяли количество клеток в бронхоальвеолярной жидкости (БАЛЖ) и уровень мРНК П6 в них, проводили дифференциальный подсчёт лейкоцитов БАЛ, оценку воспалительной инфильтрации и интерстициального отёка ткани лёгких.

Результаты. По результатам *in vitro* скрининга различных последовательностей siРНК, частично модифицированных 2'ОМе, была выбрана последовательность-лидер, снижающая уровень мРНК П6 до 35%. На основе данной последовательности была синтезирована siРНК, полностью модифицированная 2'ОМе, 2'F и тиофосфатными модификациями для повышения нуклеазоустойчивости и конъюгированная с холестерином. Холестериновый конъюгат siРНК оказывал дозозависимый биологический эффект *in vivo*. В дозе 8.5 мкг/г конъюгат снижал количество клеток в БАЛЖ мышей в 5 раз и уровень мРНК П6 в них на 71%. Гистологический анализ показал снижение воспалительной инфильтрации и интерстициального отёка лёгких, а дифференциальный подсчет лейкоцитов выявил уменьшение содержания гранулоцитов в БАЛЖ.

Выводы. Холестериновый конъюгат анти-П6 siРНК оказывает противовоспалительное действие на мышинной модели ОПЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 19-74-30011.

ФМ4. Роль макрофагального ФНО- α в контроле проведения возбуждения АВ-узлом сердца при индукции системной воспалительной реакции у мышей

Д.М. Белошанка (denis.beloshapka@gmail.com)¹, А.М. Кархов¹

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

Введение. Атриовентрикулярный (АВ) узел, являющийся ключевой структурой, определяющей проведение возбуждения между предсердиями и желудочками, помимо кардиомиоцитов, включает значительное количество т.н. «тканерезидентных» (ТР) макрофагов. Ранее установлено, что ТР макрофаги (МФ) АВ-узла формируют щелевые контакты с кардиомиоцитами и необходимы для нормального АВ-проведения возбуждения в сердце. Фактор некроза опухолей α (ФНО- α) является ключевым цитокином, продуцируемым макрофагами при развитии провоспалительной реакции (ПВР). Поскольку неизвестно, насколько значимым является ФНО- α для ТР макрофагов в АВ-узле, **цель** данной работы заключалась в оценке влияния ФНО- α на АВ-узловое проведение в норме и при ПВР.

Методы. В работе использовали мышей линии C57Bl6 дикого типа (WT) и нокаутных по ФНО- α (TNF-KO). У бодрствующих животных регистрировали поверхностную ЭКГ (эквивалент II отведения, PowerLab, AD Instruments) в контрольных условиях, а также через 24 ч после индукции системной ПВР (ЛПС *Salmonella typhi*, 2,5 мкг/г, в/б). Рассчитывали ЧСС, мощность спектра вариабельности ритма в низкочастотном диапазоне (LF, 0,15-1,5 Гц), коэффициент поударного разброса RR-интервалов (SD1/SD2), длительность волны Р, а также длительность PR-интервала ЭКГ как суррогат времени АВ-узлового проведения.

Результаты. Установлено, что у мышей WT ($n=7$) индукция ПВР привит к значимому увеличению ЧСС (с $469,4 \pm 101,5$ уд/мин до $630,5 \pm 65,0$ уд/мин, $p = 0,0041$), снижению LF (с $211,4 \pm 224,3$ мс² до $65,9 \pm 128,5$ мс²), а также укорочению PR (с $39,1 \pm 3,6$ мс до $37,0 \pm 2,1$ мс, $p = 0,0098$), но не влияет на длительность Р ($9,8 \pm 2,7$ мс; $9,3 \pm 1,5$ мс) и величину SD1/SD2 ($0,5 \pm 0,3$ мс; $0,7 \pm 0,5$ мс). У мышей TNF-KO наблюдаются разнонаправленные изменения LF, однако сходные с WT изменения ЧСС (с $366,65 \pm 43,5$ уд/мин до $494,8 \pm 180,8$ уд/мин) и параметров ЭКГ при индукции провоспалительного ответа: длительность PR снижается на фоне ПВР до значений (с $40,2 \pm 1,1$ мс до $35,3 \pm 3,4$ мс, $p = 0,0098$), сходных с таковыми у животных дикого типа.

Выводы. Не удалось подтвердить роли ФНО- α в, опосредуемой тканерезидентными макрофагами, модуляции АВ-узлового проведения возбуждения при провоспалительном ответе. Специфический тип поляризации ТР макрофагов АВ-узла, отличающийся от классического М1-типа, может обуславливать их низкую чувствительность к ФНО- α .

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-75-00023

ФМ5. Исследование биораспределения *in vivo* нано-структур содержащих тетра-фенил профенерат цинка для диагностики онкологических заболеваний

Н.С. Болдырев (nbolduz23@gmail.com)^{1,2}, Д.В. Мищенко^{2,1}, С.Д. Бондаренко², С.В. Курмаз²

¹*Государственный университет просвещения, Москва, Российская Федерация,*

²*Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Российская Федерация*

Введение. В современной медицине важна разработка новых методов лечения онкологии. Химиотерапия часто повреждает здоровые ткани, поэтому перспективна фотодинамическая терапия (ФДТ). Она использует фотосенсибилизаторы (ФС), которые накапливаются в опухолях и под действием света уничтожают раковые клетки. Один из перспективных ФС — тетрафенилпорфиринат цинка (ZnTPP), но его применение ограничено низкой растворимостью в воде. Для решения этой проблемы созданы полимерные наночастицы с ZnTPP, которые улучшают растворимость и распределение в организме, сохраняя низкую токсичность. Исследование биораспределения водорастворимых форм ZnTPP и их эффективности для диагностики и ФДТ остается актуальным. Успешные результаты могут расширить применение ZnTPP в медицине, открывая новые возможности в борьбе с онкологией.

Методы. Исследования проводились на базе УНУ «Питомник и виварий ФИЦ ПХФ и МХ РАН» с соблюдением этических норм (протокол №88 от 26.12.2023). Изучалась флуоресценция наночастиц ZnTPP (NPs1, NPs4) в физиологическом растворе и тканях с использованием гомогената мозга мыши (1,5 мг/мл). Растворы инкубировались в темноте при комнатной температуре от 5 минут до 24 часов. Флуоресцентная визуализация выполнялась системой VISQUE InVivo Smart-LF (режим Cy5.5, экспозиция 1000 мс). В экспериментах *in vivo* использовались мыши BDF1 с карциномой легких Льюиса. Растворы NPs1 и NPs4 вводились в хвостовую вену, а их распределение контролировалось по флуоресцентному сигналу до и после введения (1, 4, 24 часа). Также исследовалась флуоресценция в органах и опухолях *ex vivo*.

Результаты. Исследования биораспределения полимерных наноструктур Zn-TPP на основе тройных сополимеров ВП выявили их способность избирательно накапливаться в опухолях *in vivo* и *ex vivo*. Малый размер макромолекул и агрегатов способствует эффективному накоплению в опухолевых тканях.

Выводы. Флуоресцентный анализ подтвердил эффективность наноструктур ZnTPP для таргетной терапии. Малый размер макромолекул и агрегатов способствует их накоплению в опухолях.

ФМ6. Хроническая дисфункция тиамин-зависимых ферментов вызывает изменения метаболизма аминокислот мозга и рост тревожности животных

Н.Р. Борисова (borisovanr@mail.ru)¹, А.Л. Ксенофонов², А.В Граф³, В.И. Буник^{4,2}

¹*ПМГМУ имени И.М. Сеченова, Россия, Москва*

²*Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

³*Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

⁴*Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. Тиаминдифосфат (ТДФ) – кофермент пересекающихся путей метаболизма сахаров и аминокислот. У пациентов с хронической болезнью почек повышен уровень окситиамина (ОТ). Образующийся из него окситиаминдифосфат блокирует ТДФ-зависимые ферменты. Цель работы: охарактеризовать вызываемые при хроническом введении крысам ОТ изменения аминокислотного профиля коры мозга, поведения, ЭКГ и их взаимосвязь.

Методы. В течение 30-ти дней самцам крыс Wistar (n=15) ежедневно делали внутривбрюшинные инъекции ОТ (1,5 мг/кг), контрольным животным (n=11) – инъекции физраствора. На 31-й день определяли ЭКГ и параметры поведения в тесте «Открытое поле». В экстрактах коры мозга крыс определяли уровни аминокислот с помощью ВЭЖХ с нингидрином. Достоверность различий определяли по тесту Манна-Уитни, корреляции – по Спирмену.

Результаты. Маркерами ингибирования дегидрогеназ пирувата и разветвленных 2-оксокислот при введении ОТ было накопление аланина (p=0,06) и изолейцина (p=0,09) - продуктов трансаминирования их субстратов. Достоверные повышения уровней орнитина > гистидина > бета-аминоизобутирата > аспартата > лизина > глутамина > N-метилглицина отражали изменения метаболизма аминокислот. Аналогично действию однократной высокой дозы ингибитора ТДФ-зависимой 2-оксоглутаратдегидрогеназы, введение ОТ не меняло уровень глутамата и параметры ЭКГ, но приводило к увеличению тревожности. Так, ОТ увеличивал количество и время груминга. Наблюдаемый рост уровня N-метилглицина - модулятора глутаматергических NMDA-рецепторов – может отражать адаптации к росту тревожности. Об адаптациях к действию ОТ свидетельствуют и изменения корреляций аминокислот друг с другом и с параметрами поведения и ЭКГ.

Выводы. Хроническое введение ОТ нарушает метаболизм аминокислот коры мозга, увеличивает тревожность и изменяет взаимосвязи уровней аминокислот между собой, с параметрами поведения и ЭКГ.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В.Ломоносова

ФМ7. Оценка терапевтического эффекта комбинированной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток и нейральных прогениторных клеток на экспериментальной модели ишемического инсульта

РА Иост (romaniost_rnrtu@mail.ru)¹, ДБ Коваленко¹, ИЛ Губский^{1,2}, ДД Наместникова^{1,2}

¹*РНИМУ имени Н. И. Пирогова, Россия, Москва*

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

Введение. Трансплантация стволовых клеток (СК) является перспективным методом для терапии ишемического инсульта (ИИ). Многочисленные доклинические исследования показали безопасность и эффективность трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и нейральных прогениторных клеток (НПК). Клинические испытания также подтвердили безопасность, однако не во всех исследованиях сила терапевтического эффекта была достаточной. Актуальным остаётся разработка способов усиления эффективности клеточной терапии. Комбинированная трансплантация различных типов СК может стать одним из таких методов. Целью данного исследования являлась оценка терапевтического эффекта комбинированной трансплантации МСК и НПК у крыс с моделью экспериментального ИИ.

Методы. В эксперименте использовались человеческие плацентарные МСК и человеческие НПК, полученные методом прямого репрограммирования. Самцам крыс линии Wistar (n=65) моделировали ИИ методом транзиторной эндоваскулярной окклюзии правой средней мозговой артерии (ОСМА). Через 24 часа животные были разделены на 4 группы, производилась внутриартериальная трансплантация: МСК в дозе $2,5 \times 10^5$ + НПК в дозе $3,5 \times 10^5$; МСК в дозе 5×10^5 ; НПК в дозе 7×10^5 ; контроль – 1 мл NaCl 0,9%. В течение 14 дней оценивалась выживаемость, неврологический дефицит, объём очага инфаркта мозга и распределение СК в головном мозге.

Результаты. Показано улучшение выживаемости крыс и уменьшение объёма очага инфаркта мозга после ко-трансплантации МСК и НПК по сравнению с группой контроля и группами с монотерапией. Бинарная терапия уменьшала выраженность неврологического дефицита по сравнению с контрольной группой, однако достоверно не различалось с группами с монотерапией. При ко-трансплантации МСК и НПК детектировались внутри церебральных сосудов в течение не более 4-5 суток, а единичные НПК проходили через структуры ГЭБ.

Выводы. Комбинированная трансплантация МСК и НПК оказывала выраженное терапевтическое действие в виде улучшения выживаемости, неврологического дефицита и значимого уменьшения зоны инфаркта мозга.

ФМ8. Изоформы белка Tbx3 играют различную роль в дифференцировке кардиомиоцитов крыс

А.М. Кархов (akarchoff@gmail.com)^{1,2}, О.Б. Пустовит¹

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

²*ФГБУ «НМИЦ Кардиологии им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, Россия, Москва*

Введение. Транскрипционный фактор (ТФ) Tbx3 необходим для дифференцировки клеток-предшественников кардиомиоцитов (кмц) по типу клеток пейсмекера сердца млекопитающих. Показано, что у некоторых млекопитающих Tbx3 экспрессируется в виде альтернативных продуктов сплайсинга, обозначаемых как Tbx3 и Tbx3+2a, роль каждого из которых в дифференцировке кмц у крыс малоизучена. Таким образом, **целью** работы является выяснение путей и различий в влиянии двух изоформ Tbx3 на транскрипционный профиль кмц крыс и выяснение роли Tbx3 и Tbx3+2a морфогенезе ритмоводителя сердца

Методы. Работа выполнена с использованием культуры энзиматически выделенных неонатальных кардиомиоцитов крысы (1-2 сут), демонстрирующих пролиферативную активность. Для индукции гиперэкспрессии транскрипционного фактора Tbx3, Tbx3+2a в первичной культуре изолированных неонатальных кмц использовали плазмидный вектор, контролируемый CMV-промотером. Для анализа изменения транскрипционного профиля в нативных, Tbx3⁺, Tbx3+2a⁺ кардиомиоцитах проводили РНК-секвенирование с применением Illumina. Картирование чтений на геном проводилось при помощи STAR-анализа. Полученные данные анализировали с использованием пакетов featureCounts DESeq2.

Результаты. Гиперэкспрессия обоих изоформ ТФ TBX3 в культивируемых неонатальных кардиомиоцитах крысы вызывает значительное изменение уровня мРНК ключевых генов пейсмекерного и «рабочего» фенотипа. В частности, обе изоформы подавляют экспрессию генов коннексинов, характерных для рабочего миокарда и гена Nppa. При этом, данные изменения имели значимо более выраженный характер при гиперэкспрессии изоформы Tbx3 (Tbx3⁺). Кроме того, в обоих случаях наблюдали увеличение экспрессии генов ионных каналов, обуславливающих пейсмекерные свойства клеток. В свою очередь, увеличение экспрессии этих генов было значимо больше в Tbx3+2a⁺ кмц.

Выводы. Обе изоформы гена Tbx3 играют существенную роль в контроле экспрессии генов, связанных с морфогенезом пейсмекера в сердце крысы. При этом изоформа Tbx3 в значимо большей степени предотвращает развитие «рабочего» миокарда, а Tbx3+2a значимо повышает экспрессию «пейсмекерных» генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-75-00023

ФМ9. Влияние сверхэкспрессии гена *Deaf-1* в гиппокампе на поведение и серотониновую систему мозга мышей ASC (Antidepressants Sensitive Catalepsy) и C57BL6

А.А. Комарова (assolina.komarova@gmail.com)^{1,2}, Е.М. Кондаурова¹, Т.В. Ильчибаева¹, В.С. Науменко¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, Новосибирск

²Факультет естественных наук НГУ, Россия, Новосибирск

Введение. Имеется множество данных о роли серотонинового рецептора 1 типа (5-HT_{1A}) в механизмах тревоги и депрессии. DEAF-1 (деформированный эпидермальный ауторегуляторный фактор 1) – один из транскрипционных факторов, регулирующих активность экспрессии гена *Htr1a*. Целью работы является изучение влияния сверхэкспрессии гена *Deaf-1* в гиппокампе на поведение и серотониновую систему мозга мышей с генетически детерминированным депрессивноподобным поведением – ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) и мышей линии C57BL6.

Методы. Двухмесячным самцам мышей линий C57BL6 и ASC в гиппокампы вводили аденоассоциированные вирусные частицы, несущие ген *Deaf-1* и eGFP («опыт», n=10) или только eGFP («контроль», n=10) под синансинальным промотером. Через 5 недель после введения конструктора проводились поведенческие тесты для оценки депрессивноподобного, тревожного и социального поведения. С помощью метода ПЦР в реальном времени проводилась оценка уровня мРНК гена *Deaf-1* и генов серотониновой системы, в том числе 5-HT₇-рецептора (ген *Htr7*), митоген-активируемой протеинкиназы (ген *Mapk3*) и циклин-зависимой киназы (ген *Cdk5*).

Результаты. Введение конструктора, содержащего целевой ген, в гиппокампы привело к повышению уровня мРНК гена *Deaf-1* в гиппокампе мышей C57BL6 и ASC, однако не повлияло на уровень мРНК генов *Htr1a* и *Htr7*. Сверхэкспрессия гена *Deaf-1* привела к снижению уровня мРНК гена *Cdk5* в гиппокампе мышей ASC и снижению уровня мРНК гена *Mapk3* у C57BL6. В тесте «открытое поле» у опытной группы наблюдалось снижение количества умываний и увеличение количества вертикальных стоек у линии ASC. В тесте «принудительное плавание» сверхэкспрессия гена *Deaf-1* повысила скорость изменения силуэта у мышей линии C57BL6. В трехкамерном тесте сверхэкспрессия гена *Deaf-1* привела к снижению времени обнюхивания у линии C57BL6, а в тесте «резидент-интродер» повысила время социального взаимодействия животных линии ASC.

Выводы. Было показано, что сверхэкспрессия транскрипционного фактора DEAF-1 в гиппокампе оказывает влияние на депрессивноподобное, тревожное и социальное поведение мышей. Однако животные линий ASC и C57BL6 показали различную чувствительность к введению конструктора.

ФМ10. Нарушения в иммунном ответе отличаются у мышей с нокаутом Cdk8/19 и у мышей Polg с митохондриальной дисфункцией

К.К. Кочегарова (ksushakochegarova@gmail.com)^{1,2}, Е.А. Варламова¹, Ю.Ю. Силаева²

¹Лаборатория молекулярной онкобиологии, Институт биологии гена РАН, Россия, Москва

²Центр коллективного пользования, Институт биологии гена РАН, Россия, Москва

Введение. Циклинзависимая киназа 8 (CDK8) и ее паралог CDK19 регулируют транскрипцию, фосфорилируя в том числе белки семейства STAT, которые принимают участие в рецепции цитокинов Т-клетками, а также в процессах окислительного фосфорилирования. При активации Т-клеток повышается регуляция окислительного фосфорилирования, а ингибирование митохондриальной функции ухудшает пролиферацию Т-клеток. Известно, что мутации в *STAT1* приводят к развитию иммунодефицитов, а нокаут *cdk8/19* — к нарушению деления митохондрий, однако связь между функционированием митохондрий в иммунных клетках и CDK8 пока не изучена. Цель нашей работы — сравнить механизмы влияния митохондриальной дисрегуляции на иммунитет у мышей с двойным нокаутом *cdk8/19* и известной моделью митохондриальной дисфункции *Polg*.

Методы. Исследования проводили на мышах с двойным нокаутом *cdk8/19* и мышах с мутацией в гене полимеразы гамма (*polg*), осуществляющей репликацию митохондриальной ДНК. Иммунофенотипирование проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Для изучения иммунного ответа *in vivo* мышам инъецировали аллогенную опухоль p815, а индукцию пролиферации лимфоцитов *in vitro* проводили с помощью конканавалина А (5мкг/мл). Уровень белков исследовали вестерн-блоттингом.

Результаты. Обнаружено повышенное число эффекторных CD8+ Т-клеток в селезенках мышей *Polg* (в 4 раза относительно контроля) и сниженное — у мышей DKO (в 2 раза). При стимуляции иммунного ответа *in vivo* и *in vitro* у мышей *Polg* наблюдалась сниженная пролиферативная активность лимфоцитов: в ответ на инъекции опухоли процент эффекторных CD8+ лимфоцитов *Polg* был снижен на 20%, а в культуре спленоциты *Polg* пролиферировали почти в 1,5 раза медленнее, чем контроль. Напротив, у мышей DKO мы наблюдали увеличенную в 1,5 раза пролиферацию *in vitro*. Анализ белка в спленоцитах *Polg* выявил повышенные уровни Bad и Bcl-w, но сниженные уровни Stat3/5, что может указывать на наличие митохондриального апоптоза.

Выводы. Продемонстрированы различия в исследуемых показателях активности иммунитета в двух линиях мышей. Вероятно, если митохондриальная дисрегуляция у мышей DKO влияет на функционирование иммунитета, то по иным механизмам, чем у мышей *Polg*.

ФМ11. Изучение влияния хомогенетической активации астроцитов на синаптическую передачу в гиппокампе мышей *in vitro*

Р.Р. Мифтахов (*rasimmiftahov200@gmail.com*)^{1,2}, А.Б. Зюзина², П.А. Фортыхина², А.А. Бородинова²

¹Медико-биологический факультет РНИМУ им.Н.И. Пирогова, Россия, Москва

²Лаборатория клеточной нейробиологии обучения ИВНД и НФ РАН, Россия, Москва

Введение. Астроциты участвуют в передаче информации в мозге наряду с пре- и постсинаптическими окончаниями нейронов, образуя трехчастный синапс. Астроциты способны модулировать работу нейронов с помощью глито-трансммиттеров, таких как D-серин и ацетилхолин. Внутриклеточная передача сигнала в астроцитах осуществляется благодаря ионам Ca^{2+} , повышение уровня которых происходит при активации метаболитных рецепторов, связанных с G белком (GPCR). Для исследований нейроглиальных взаимодействий активно используется хомогенетический подход, основанный на встраивании в мембрану астроцитов дизайнерских рецепторов, активируемых исключительно дизайнерскими препаратами (DREADD). Например, в большом количестве исследований используется вариант DREADD рецепторов hM3Dq, который специфически активируется производным клозапина - Compound 21 (C21) и запускает Gq-сопряженный сигнальный каскад в клетке-мишени. Целью исследования было определение влияния активации астроцитов гиппокампа, экспрессирующих Gq-сопряженные DREADD, на сетевые и молекулярные процессы в гиппокампе мышей линии B6SJL.

Методы. Для экспрессии hM3Dq в астроцитах гиппокампа области CA1 мы использовали аденоассоциированные вирусы (AAV2/5). Запись и оценку амплитуды полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (fEPSP) проводили на срезах гиппокампа мышей линии B6SJL в возрасте 6-8 месяцев. После записи, срезы были использованы для оценки уровня экспрессии немедленных ранних генов при помощи метода количественной ПЦР (qPCR).

Результаты. Мы обнаружили, что в покое активация hM3Dq в астроцитах при помощи C21 не влияет на амплитуду fEPSP в срезах гиппокампа мышей. Однако, через 90мин после индукции долговременной потенциации на фоне C21 происходит значимое увеличение амплитуды fEPSP по сравнению с ответами в контрольной группе без хомогенетической стимуляции астроцитов. Также мы не обнаружили изменений уровня экспрессии генов *Fos*, *Egr1* и *Arc* в срезах мозга при активации Gq-каскада в астроцитах с помощью C21, по сравнению с контрольными образцами.

Выводы. Активация Gq-каскада в астроцитах способна модулировать долговременную синаптическую пластичность в срезах гиппокампа мышей и не затрагивать при этом экспрессию генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 24-15-00149.

ФМ12. Нокаут Cdk8/19 приводит к нарушению метаболизма нейронов в коре головного мозга мышей C57bl/6

Ю.А. Опарина (yulka.oparina@ya.ru)¹, Е.А. Варламова¹, Е.Н. Кислухина²

¹Лаборатория молекулярной онкологии, Институт биологии гена РАН, Россия, Москва

²ФГАУ "НМИЦ здоровья детей" МР, Россия, Москва

Введение. Циклинзависимые протеинкиназы CDK8 и CDK19 имеют важное значение в регуляции транскрипции генов за счет взаимодействия с компонентами медиаторного комплекса и/или фосфорилирования различных транскрипционных факторов. CDK8/19 играют важную роль в различных клеточных процессах, включая дифференцировку, пролиферацию и апоптоз. Пациенты с мутациями в *Cdk8/19* имеют отклонения в развитии нервной системы, а в нейронах *C. elegans* CDK8/19 играют критическую роль в развитии, функционировании и поддержании нейрональной сети. Известно, что CDK8/19 принимают участие в процессах митохондриальной динамики, что особенно важно для высокоэнергетозависимых клеток, таких как нейроны.

Методы. Изучение влияния нокаута *Cdk8/19* на развитие тревожности и формирование памяти проводили на мышах линии *Cdk8^{fl/fl}/Cdk19^{-/-}/Emx1-Cre*. Жизнеспособность нейронов оценивали *in vitro* на клетках первичной нейроглиальной культуры (E16.5) мышей дикого типа C57Bl/6, подавляя активность CDK8/19 ингибитором сенексином Б (SenB). На 5 день после инкубации оценивали выживаемость клеток методом МТТ-теста в присутствии SenB. Анализ изменений уровня белков или экспрессии генов методами вестерн-блоттинга или ПЦР в реальном времени соответственно проводили через 24-72 часа инкубации с SenB *in vitro*, а также *in vivo* через 2 месяца после активации нокаута *Cdk8/19* у мышей *Cdk8^{fl/fl}/Cdk19^{-/-}/Rosa/Cre/ERT2*.

Результаты. Анализ поведенческих тестов показал, что мыши ДКО реже выходят в светлый отсек, чем контрольные, что может быть вызвано повышенной тревожностью. При этом у ДКО наблюдалась более высокая исследовательская активность. Полученные данные указывают на наличие гиперактивности у мышей ДКО. Мы показали, что через 5 дней культивирования *in vitro* SenB вызывает гибель клеток ($IC_{50} = 0,3$ мкМ). Анализ уровня белков нейронов *in vitro* показал, что в ответ на ингибирование CDK8/19 происходит активация молекулярных путей ответа на стресс (Akt, ERK1/2, c-Jun, PKA) и маркеров апоптоза (расщепление PARP). При этом в тканях головного мозга мышей ДКО мы наблюдали менее выраженный эффект, что может указывать на наличие компенсаторных механизмов.

Выводы. Результаты показали, что CDK8/19 необходимы для жизнеспособности нейронов *in vitro*, а подавление их киназной активности или элиминирование вызывает метаболические нарушения как *in vitro*, так и *in vivo*. Вероятно, эти изменения способствуют повышенной тревожности и гиперактивности мышей ДКО, однако это требует дальнейшего изучения.

ФМ13. Иммунопротеасомы при травме спинного мозга у крыс линий SD и DA

Д.А. Орлова (dorlova01@yandex.ru)¹, А.А. Кудряева¹, А.С. Чернов¹, А.А. Белогуров¹

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

Введение. Травма спинного мозга (ТСМ) представляет собой серьезную медицинскую и социальную проблему, влекущую за собой значительное снижение качества жизни пациентов. Хроническое воспаление при ТСМ способствует образованию глиального рубца, что препятствует восстановлению функций спинного мозга после травмы. В целом, механизм развития воспалительного ответа уже известен, однако до сих пор ведутся споры касательно точной временной динамики воспаления и о роли отдельных провоспалительных факторов и типов клеток в патогенезе ТСМ. С использованием инновационного метода криоапликации нами была разработана модель травмы спинного мозга на крысах линий SD и DA. Образцы, полученные от животных, выведенных из эксперимента в различных временных точках, были проанализированы для исследования динамики воспалительного ответа и индукции иммунопротеасом.

Методы. Криоапликация (Th13 позвонка крыс), Bio-Plex, иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг.

Результаты. В результате проведенных исследований было установлено, что экспрессия субъединиц, характерных для иммунопротеасом, $\beta 5i$ (PSMB8), $\beta 1i$ (LMP2) и $\beta 2i$ (LMP10), была повышена к 14-му дню у крыс линии DA и к 7-му дню у крыс линии SD. Полученные профили цитокинов и хемокинов в поврежденных и прилегающих участках спинного мозга крыс DA и SD после травмы достигали максимального уровня в острую фазу (0-48 часов) и постепенно снижались до фонового уровня к концу подострой фазы. В поврежденной области у крыс обеих линий наблюдались значительные концентрации CXCL1, CCL2, CCL3, IL-6, TNF α и G-CSF. ИФА анализ уровня антител к основному белку миелина (MBP) в плазме крови крыс линии DA, которым вводили антитело против рецептора CCR4 (могамулизумаб), показал, что в группе животных, подвергавшихся лечению, уровень аутоантител к MBP был значительно снижен в сравнении с контрольной группой, не получавшей терапию.

Выводы. Идентифицированы преобладающие цитокины и хемокины в ЦСЖ и в плазме крови крыс при ТСМ. Индукция иммунопротеасом начинается через 168 часов, после ТСМ. Кроме того, установлено, что могамулизумаб может быть потенциальным лекарственным средством для супрессии аутореактивной компоненты адаптивного иммунитета при ТСМ.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23-74-00053.

ФМ14. Изучение путей созревания нейротрофина мозга в регенерирующих моторных синапсах

Д.А. Потапова (potapovadiana2001@mail.ru)¹, П.О. Богачева¹

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

Введение. Параметры передачи сигналов в моторных синапсах подлежат аутокринной и паракринной регуляции со стороны ряда соединений, в их числе нейротрофин мозга (BDNF) и продукты его созревания — пронеуротрофин (proBDNF) и образующийся при протеолизе proBDNF продомен. У каждого из этих соединений были обнаружены собственные влияния на синаптическую передачу. Кроме того, в ходе образования моторных синапсов баланс секреции BDNF/proBDNF играет важную роль, определяя выживание или элиминацию контакта. Поэтому важно представлять механизмы протеолиза proBDNF в новообразованных синапсах.

Целью данной работы было изучение внутри- или внеклеточного созревания эндогенного BDNF за счет протеолиза proBDNF в регенерирующих моторных синапсах мыши.

Методы. Исследования проводили на новообразованных в ходе регенерации нерва моторных синапсах m. EDL мыши. Регистрировали одноквантовые миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) при помощи стандартной микроэлектродной методики. Для статистической обработки использовали критерии Стьюдента, Манна-Уитни и ANOVA.

Результаты. Известно, что proBDNF вызывает снижение частоты МПКП путем активации каналов GIRK. Зрелый BDNF и продомен же приводят к увеличению размера кванта ацетилхолина и амплитуды МПКП. Для стимуляции выброса эндогенных нейротрофинов использовали агонисты PAR-рецепторов. Ингибирование матриксной металлопротеиназы 3 типа не предотвратило протеолиз proBDNF - наблюдали увеличение амплитуды МПКП, характерное для зрелого BDNF. Однако при ингибировании фурина удалось заблокировать внутренний путь расщепления proBDNF – наблюдали снижение частоты МПКП, характерное для proBDNF. Это показывает, что в новообразованных моторных синапсах proBDNF расщепляется преимущественно не в синаптической щели, а внутриклеточно, с участием фурина. Таким образом, негативное влияние пронеуротрофина на выживание синапсов и уровень передачи сигналов может нивелироваться положительным действием продуктов его протеолиза.

Выводы. В регенерирующих моторных синапсах преобладает внутриклеточное созревание нейротрофина мозга, что приводит к секреции зрелого BDNF и, возможно, продомена, оказывающих положительное влияние на синаптическую передачу.

Работа поддержана грантом РНФ 24-25-00073

ФМ15. Склонность к никотиновой зависимости у взрослых крыс, переживших пренатальную гипоксию, связана с глюкокортикоид-зависимым нарушением экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в структурах лимбической системы мозга

С.С. Потапова (so iya-potapova@mail.ru)¹, О.В. Ветровой¹

¹*Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург*

Введение. Анамнезы пациентов указывают на роль пренатальной гипоксии в нарушении развития лимбической системы и формировании склонности к аддикциям у потомства, но до сих пор не достигнуто понимание конкретных механизмов. Данная работа была посвящена дифференциальному анализу роли гипоксии и глюкокортикоидного стресса во время беременности в формировании склонности к никотиновой зависимости у потомства. Для достижения данной цели были использованы модель ишемии плацентарных артерий (ИП) и модель тяжелой гипобарической гипоксии, которой подвергали беременных самок (пренатальная гипоксия, ПГ).

Методы. Работу проводили на эмбрионах, новорожденных и взрослых крысах, переживших ПГ или ИП. С помощью методов вестерн-блот, ПЦР в реальном времени, ИФА и энзиматических методов мы оценили влияние ПГ и ИП на экспрессию HIF1 α , HIF1-зависимый метаболизм, метаболизм ацетилхолина и экспрессию ацетилхолиновых рецепторов в мозге, а также активность глюкокортикоидной системы. С помощью поведенческих тестов мы оценили влияние ПГ и ИП на склонность к развитию никотиновой зависимости и выраженность синдрома отмены у взрослых животных.

Результаты. Анализ показал, что ПГ и ИП не влияют на метаболизм ацетилхолина, но вызывают стабильные HIF1 α -зависимые изменения метаболизма в мозге. При этом ПГ (но не ИП) во взрослом возрасте вызывает снижение экспрессии глюкокортикоидных рецепторов и глюкокортикоид-зависимой транскрипции, в том числе никотиновых ацетилхолиновых рецепторов $\alpha 7$ -nAChR в клетках префронтальной коры и гиппокампа и их терминалях к прилежащему ядру без изменений дофаминергической иннервации, что сопровождается склонностью к никотиновой зависимости.

Выводы. Результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод, что именно стрессорная глюкокортикоидная реакция материнского организма на гипоксию вызывает склонность к развитию никотиновой зависимости у потомства во взрослом возрасте за счет нарушения экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и префронтальной коре, опосредованного этим снижения экспрессии $\alpha 7$ -nAChR, вызывающего нарушение глутаматергической иннервации прилежащего ядра.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-75-00003

ФМ16. Изучение влияния прогестерона при обструктивном холестазах у крыс на процессы, связанные с обменом холестерина

А.К. Распорова (aleksa.rasp1709@gmail.com)¹, Т.А. Щелкунова¹, Н.С. Сиротина¹, О.В. Смирнова¹

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

Введение. Прогестерон – стероидный гормон, обладающий широким набором эффектов, обеспечиваемых наличием двух типов рецепторов: ядерных и мембранных. Было показано, что в печени самцов и самок крыс, преобладает экспрессия мембранных рецепторов прогестерона, в то время как ядерные определяются на уровне фона, что делает данный орган удобным для изучения эффектов от активации мембранных изоформ. Повреждения желчного протока могут приводить к развитию холестаза – известно, что данное состояние может развиваться у беременных в 3 триместре, когда уровень прогестерона достигает своего максимума, поэтому изучение влияния прогестерона на экспрессию ключевых генов-мишеней обмена холестерина и желчных кислот является целью данной работы.

Методы. В работе использовались половозрелые овариэктомированные самки стока Wistar с перевязанным желчным протоком, получавшие прогестерон (n=6) или растворитель (n=7). Через 14 дней животные подвергались гуманной эвтаназии, у них собирали образцы печени, сыворотки и желчи. В печени методом обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени определяли экспрессию выбранных генов мишеней, в сыворотке методом ИФА определяли прогестерон, ферментативным методом – липазу и желчные кислоты в сыворотке и желчи.

Результаты. Достоверная разница между группами в уровнях липазы и желчных кислот в сыворотке отсутствовала. Концентрация желчных кислот в желчи имела тенденцию к снижению в группе животных, получавшей прогестерон. Достоверное снижение уровня мРНК показано для ферментов синтеза (Cyp27a1, Cyp7a1) и конъюгирования желчных кислот (BACS), транспортёра MRP3 у животных с введением прогестерона, у них же отмечалась повышенная экспрессия гена рецептора желчных кислот TGR5. Общее снижение ферментов синтеза желчных кислот может выступать благоприятным фактором для облегчения протекания обструктивного холестаза, а повышение экспрессии TGR5 способствует снижению провоспалительных процессов в печени, её регенерации и сохранению архитектоники.

Выводы. По полученным данным можно предположить о положительном влиянии прогестерона на процессы обмена холестерина при обструктивном холестазах.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032300075-6

ФМ17. Влияние изомеризации аминокислотного остатка Asp7 в бета-амилоиде на его способность индуцировать патологию в инъекционной модели болезни Альцгеймера

А.Д. Рыбак (sasha_ish2@gmail.com)^{1,2}, К.А. Мухина², О.И. Кечко², В.А. Митькевич²

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

²*ФГБУН ИМБ РАН, Россия, Москва*

Введение. Болезнь Альцгеймера (БА) – самый распространенный вид деменции. Основными признаками БА являются образование амилоидных бляшек, состоящих из пептида бета-амилоида ($A\beta$), и нейрофибриллярных клубков тау. Патогенез БА сопровождается воспалением, окислительным стрессом и нарушением работы ацетилхолиновой системы. Более 50% амилоидных пептидов в мозге пациентов с БА изомеризовано по остатку Asp7 (изо $A\beta$). Изо $A\beta$ нейротоксичнее, чем $A\beta$, и больше склонен к агрегации. Однако, до сих пор недостаточно изучена роль изо $A\beta$ в развитии заболевания на ранних стадиях. Данная работа посвящена сравнению способности $A\beta$ и изо $A\beta$ индуцировать патологию в инъекционной модели БА.

Методы. Для создания инъекционной модели БА мышам BALB/c вводили $A\beta$ или изо $A\beta$ в желудочек мозга. Поведение животных оценивали в тестах «Открытое поле» и «Социальное взаимодействие» на 14-й и 21-й день после инъекции. Гомогенаты мозга анализировали через месяц после инъекции амилоида при помощи методов TBARS, Элмана, измерения продукции активных форм кислорода (АФК), анализа активности холинэстераз, ОТ-ПЦР, вестерн-блоттинга и иммуноферментного анализа.

Результаты. Изо $A\beta$ раньше, чем $A\beta$ вызывал увеличение уровня агрессии и тревожности экспериментальных животных. Данные поведенческие изменения коррелировали с активацией микроглии и астроцитов под действием изо $A\beta$. Активация клеток мозга приводила к увеличению экспрессии генов провоспалительных интерлейкинов IL-4 и IL-1 β , индуцируемой NO-синтазы и фактора NF κ B. Оба амилоидных пептида вызывали развитие окислительного стресса, что подтверждалось увеличением уровня АФК и перекисных липидов. При этом уровень восстановленного глутатиона снижался сильнее под действием изо $A\beta$, чем под $A\beta$. Изо $A\beta$, но не $A\beta$, индуцировал патологию тау, снижая общий уровень тау при одновременном увеличении его фосфорилирования. Кроме того, под действием амилоидных пептидов изменялся уровень $\alpha 4$ и $\alpha 7$ субъединиц никотиновых ацетилхолиновых рецепторов и активность ацетил- и бутирилхолинэстераз.

Выводы. Изо $A\beta$ ускоряет развитие патологии в инъекционной модели БА, усиливая развитие воспаления и окислительного стресса, приводя к более ранним поведенческим нарушениям у экспериментальных животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 19-74-30007.

ФМ18. Влияние тиреоидных гормонов на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз

В.А. Сбитнева (viktoria.sbitneva@yandex.ru)

ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, г. Тюмень

Введение. Актуальность. Гормоны щитовидной железы оказывают различные эффекты на систему гемостаза, это подтверждается тем, что субклинические или явные дисфункции щитовидной железы могут быть связаны с состоянием гипокоагуляции или гиперкоагуляции. Нарушения коагуляции и фибринолиза являются многофакторными, и все больше данных свидетельствуют о том, что эндокринопатии модулируют гемостатический баланс.

Цель: изучение изменений и установление взаимосвязей показателей агрегационной активности тромбоцитов с провоспалительными цитокинами у пациентов с субклиническим и манифестным гипотиреозом.

Методы. Пациенты обоих полов в возрасте 20-60 лет (50 человек) с субклиническим или манифестным гипотиреозом и принимали препарат левотироксин натрия. Контрольная группа-практически здоровые добровольцы, сходные по полу и возрасту. Изучение агрегационной активности тромбоцитов (спонтанная и АДФ-индуцированная агрегация, время достижения макс.агрегации и размер образовавшихся тромбоцитарных агрегатов) проводили на лазерном агрегометре «Биола», в качестве индуктора агрегации был выбран раствор АДФ. Иммуноферментным методом определяли уровень гомоцистеина.

Результаты. У пациентов с гипотиреозом наблюдалось повышение спонтанной агрегации 2,4(1,0; 6,3)%, превысив показатель контроля 1,10(1,0;1,28)% практически в 2,1 раза. Исследование показателей АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов показало достоверное снижение всех показателей агрегационной активности относительно группы здоровых ($p < 0,05$): снижение агрегационной активности 9,0(1,9; 21,2)% и макс.скорости 12,0(10,1; 25,3)%/мин при одновременном удлинении времени достижения макс.агрегации 279,0(225,0;293,0) и макс.скорости агрегации 54,0(27,0; 190,0)сек.

Уровень гомоцистеина достоверно не различался между группами ($p > 0,05$). По результатам корреляционного анализа обнаружена обратная взаимосвязь между концентрацией гомоцистеина и размером тромбоцитарного агрегата ($r_s = -0,513$; $p < 0,05$), скоростью ($r_s = -0,465$; $p < 0,05$) и временем его образования ($r_s = -0,501$; $p < 0,05$).

Выводы. Результаты исследований показывают, что даже при проводимой заместительной терапии левотироксином натрия, исследуемые показатели агрегационной активности тромбоцитов отличаются от группы контроля. Гипофункция щитовидной железы сопряжена со снижением показателей АДФ-индуцированной агрегации при увеличении спонтанной агрегации. Показатели функциональной активности тромбоцитов связаны с уровнем гомоцистеина.

ФМ19. Дозозависимые эффекты этанола в моторных синапсах мышцы

Д.С. Спесивцев (spesivcev2004@mail.ru)¹, П.О. Богачева¹

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

Введение. Этанол является распространенным органическим растворителем веществ, применяемых для исследований в физиологии. Однако при достижении определенных концентраций в рабочем растворе этанол может оказывать собственное влияние на изучаемые параметры. Данные о влиянии этанола на параметры синаптической передачи в нервно-мышечных синапсах позвоночных довольно противоречивы. Целью исследования было выявление дозозависимости эффектов этанола и выяснение их предположительных механизмов в моторных синапсах мышцы.

Методы. Исследования проводились на нервно-мышечных препаратах m. EDL мышцы. Для регистрации спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) использовали стандартную микроэлектродную технику отведения биопотенциалов. Для статистической обработки данных использовали критерий Манна-Уитни и t-тест Стьюдента.

Результаты. Этанол в наиболее распространенной при применении в качестве растворителя дозе (0,01%) никак не влиял на параметры МПКП. Этанол (0,5%) достоверно увеличивал время нарастания и время спада МПКП, то есть оказывал постсинаптический эффект; при этом амплитуда и частота МПКП не изменялась по сравнению с контрольными значениями. Этанол (5%) достоверно увеличивал амплитуду, частоту, время нарастания и время спада МПКП. Эти эффекты быстро исчезали при отмывке препаратов в нормальном физиологическом растворе, что говорит о том, что этанол не причиняет необратимых повреждений нервным и мышечным клеткам. Увеличение амплитуды и частоты МПКП могло быть следствием выброса депонированного кальция. Однако блокатор рианодиновых рецепторов дантролен (10 мкМ) не предотвратил эффекты этанола (5%). Стабилизатор мембран кетотифен (10 мкМ) также оказался не способен вернуть параметры МПКП к контрольным значениям. В обоих случаях отмывка препаратов от смеси реагентов снимала эффекты этанола.

Выводы. В моторных синапсах мышцы этанол в высоких дозах оказывает влияние на параметры МПКП путем, не зависящим от активации рианодиновых рецепторов внутриклеточных депо или от изменения состояния клеточной мембраны, кроме этого, действие этанола на нервно-мышечные синапсы обратимо.

ФМ20. Исследование влияния карбонил-цианид-4-(трифторметокси)-фенилгидразона (FCCP) на развитие атопического дерматита у мышей

А. В. Степанова (arina_stepanova936@mail.ru)¹, А. Н. Павлюченкова^{2,3}, М. С. Смирнов^{3,2}, М. А. Челомбитко²

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

²*Отдел биоэнергетики, научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, Россия, Москва*

³*Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. Атопический дерматит (АД) — распространенное хроническое воспалительное заболевание кожи, связанное с нарушением эпидермального барьера. Несмотря на прогресс в изучении АД, многие аспекты его патогенеза, включая роль митохондриальной дисфункции и нарушений клеточной дифференцировки, остаются не до конца изученными. Окислительный стресс и дисфункция митохондрий играют ключевую роль в развитии АД, что делает вещества, влияющие на митохондрии, потенциальными средствами для лечения этого заболевания. В настоящей работе мы исследовали терапевтический потенциал карбонил-цианид-4-(трифторметокси)фенилгидразона (FCCP), разобщителя окислительного фосфорилирования, в модели DNFB-индуцированного атопического дерматита ушей мышей самок линии BALB/c.

Методы. Была проведена оценка влияния FCCP на клинические проявления дерматита, на микроскопическое строение тканей уха с использованием как гистологических, так и иммуногистохимических методов. Кроме того было исследовано влияние FCCP на экспрессию ряда генов в тканях уха животных методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. Результаты оценки клинических признаков атопического дерматита продемонстрировали, что FCCP снижает такие проявления дерматита, как краснота, сухость и шелушение. Гистологический и иммуногисто-химический анализ показали, что FCCP уменьшает толщину эпидермиса и уровень дегрануляции тучных клеток в коже ушей животных с атопическим дерматитом, а также снижает степень инфильтрации ткани макрофагами (F4/80⁺-клеток) и фибробластами (TGFb⁺-клеток). Результаты оценки экспрессии ряда генов выявили снижение уровня провоспалительного цитокина TNF-α, а также генов белков, играющих критическую роль в дифференцировке эпидермиса (лорикрин, филлагрин, кератин 10), в тканях уха мышей с АД.

Выводы. Таким образом, полученные результаты указывают на терапевтический потенциал FCCP для лечения атопического дерматита.

ФМ21. Перmissive действие гормонов на стволовые клетки взрослого организма человека

В.П. Сулягина (alicekitova@yandex.ru)

Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) – это стволовые клетки взрослого организма, выполняющие функцию поддержания гомеостаза и формирования стромы. В жировой ткани МСК осуществляют также обновление клеток ткани. Жировая ткань высокопластична, поэтому нарушение её обновления, приводящее к гипертрофии адипоцитов и их инсулинорезистентности, может стать причиной развития различных патологий. На выбор пути дифференцировки МСК влияют гормоны, поэтому изучение данного процесса важно для создания препаратов для лечения широкораспространённых сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний.

Методы. Опыты проводились на МСК из подкожной и висцеральной жировой ткани, выделенных из одних и тех же доноров. МСК обрабатывались сначала цАМФ-мобилизующими гормонами (норадреналин, серотонин, паратиреоидный гормон), а затем кальций-мобилизующими гормонами. Интенсивность кальциевого ответа оценивалась с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием красителя Fluo8. Затем изучалось воздействие комбинаций гормонов, усиливающих кальциевый ответ МСК по сравнению с одиночным добавлением гормона, на дифференцировку МСК в адипоциты. Субтипы адипоцитов определялись методом ПЦР в реальном времени по уровню экспрессии ключевых маркеров адипогенной дифференцировки адипонектина, лептина, PPAR γ , UCP-1.

Результаты. Было показано, что МСК из висцеральной и подкожной жировой ткани обладают разной чувствительностью к одним и тем же комбинациям гормонов, что, по-видимому, связано с их различной функцией и регуляцией в организме. У пациентов, МСК которых после преинкубации с норадреналином не показали усиления кальциевого ответа на норадреналин, не наблюдалось также усиления кальциевого ответа на другие кальций-мобилизующие гормоны. Преинкубация МСК с норадреналином приводила к повышению чувствительности МСК к норадреналину и ангиотензину II, а серотонин – к гистамину в МСК подкожной жировой ткани. Преинкубация с паратиреоидным гормоном повышала чувствительность к аденозину в МСК висцеральной жировой ткани. При этом двукратная стимуляция МСК норадреналином приводила к дифференцировке МСК в сторону бежевых адипоцитов.

Выводы. Выявлено перmissive действие норадреналина, серотонина и паратиреоидного гормона, приводящее к усилению кальциевого ответа МСК из подкожной и висцеральной жировой ткани.

ФМ22. Влияние сверхэкспрессии гена 5–НТ7 рецептора в астроцитах фронтальной коры на поведение и серотониновую систему мозга мышей линии C57BL/6

У.С. Устинова (ustinova01@gmail.com)^{1,2}, Д.В. Базовкина², С.Н. Адонина²

¹*Факультет естественных наук НГУ, Россия, Новосибирск*

²*Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, Новосибирск*

Введение. Серотониновые 5-НТ7 рецепторы участвуют в патогенезе аффективных расстройств, что делает их важной терапевтической мишенью. Они широко экспрессируются не только в нейронах, но и в астроцитах, которые способны модулировать активность нейронов. Известно, что аномальные изменения в передаче сигналов Ca^{2+} в этих глиальных клетках приводят к нарушениям в работе серотониновой системы мозга и могут способствовать развитию депрессии. Таким образом, целью работы было изучение эффектов введения во фронтальную кору мышей линии C57BL/6 вирусного конструкта рAAV-hGFAP-5HTR7-tdTomato-WPRE, вызывающего в астроцитах сверхэкспрессию гена 5-НТ7-рецептора, на поведение и серотониновую систему мозга.

Методы. Исследование проводили на половозрелых самцах мышей линии C57BL/6, поделенных на опытную группу (вводили конструкт с целевым геном, n=10) и контрольную группу (вводили конструкт без целевого гена, n=10). Влияние сверхэкспрессии оценивали через 4 недели после введения. Поведение оценивали в тестах «открытое поле», «принудительное плавание» и в трехкамерном тесте. Экспрессию генов в структурах мозга мышей определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровни серотонина и его метаболита 5-ГИУК измеряли с помощью ВЭЖХ. Результаты обрабатывали с помощью Т-критерия Стьюдента.

Результаты. У мышей, получивших конструкт с целевым геном, было показано увеличение уровня мРНК гена 5-НТ7 рецептора во фронтальной коре ($p < 0,001$). Сверхэкспрессия гена 5-НТ7 рецептора привела к снижению предпочтения социального объекта в трехкамерном тесте ($p < 0,05$) и увеличению времени депрессивноподобного замирания в тесте «принудительное плавание» ($p < 0,05$). Было показано также снижение экспрессии гена рецептора 5-НТ1А во фронтальной коре по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Анализ данных ВЭЖХ показал, что сверхэкспрессия гена 5-НТ7 рецептора привела к снижению уровня серотонина в коре ($p < 0,01$) и повышению индекса метаболизма в коре и гиппокампе мышей ($p < 0,05$). Напротив, повышение уровня серотонина ($p < 0,01$) и снижение индекса метаболизма нейромедиатора ($p < 0,05$) было обнаружено в гипоталамусе опытной группы мышей.

Выводы. Таким образом, сверхэкспрессия гена 5-НТ7-рецептора в астроцитах фронтальной коры изменяет поведение и активность серотониновой системы мозга мышей.

ФМ23. Биохимия реакции окислительного стресса при ишемии миокарда

Фазлиддинова Шахина Шухратовна (shahinafazliddinova@icloud.com)^{1,1}, Д.У. Мамиржоновна^{1,1}, Д.А. Акалаева^{1,1}

¹Ташкентская медицинская академия, Узбекистан, Ташкент

Введение. Ишемия миокарда — недостаточное кровоснабжение сердечной мышцы, сопровождающееся окислительным стрессом, который повреждает кардиомиоциты, способствует воспалению и запускает апоптоз. Главный источник активных форм кислорода (АФК) - митохондрии, чья дисфункция усугубляет ишемическое повреждение. Антиоксидантные ферменты не справляются с нейтрализацией АФК, что делает понимание этих процессов важным для разработки терапевтических стратегий.

Методы.

Измерение уровня АФК (DCFDA-зонд).

Оценку митохондриального мембранного потенциала (JC-1).

Определение активности антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза, глутатионпероксидаза).

Иммуноферментный анализ (ELISA) уровней воспалительных маркеров (IL-6, TNF-α).

Гистохимический и морфологический анализ повреждений миокарда.

Результаты. анализ показал, что значительное повышение уровня активных форм кислорода (АФК) в условиях ишемии миокарда. Анализ с использованием флуоресцентного зонда DCFDA продемонстрировал резкое увеличение супероксид-анионов и пероксида водорода, в фазе реперфузии. Это подтверждает развитие окислительного стресса и его усугубление в период восстановления кровотока. Оценка митохондриальной функции с использованием индикатора JC-1 выявила значительное снижение мембранного потенциала митохондрий в условиях ишемии, что свидетельствует о митохондриальной дисфункции. Активность антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза и глутатионпероксидаза, была существенно снижена в ишемизированных клетках, что указывает на дефицит защитных механизмов. Гистологическое исследование показало морфологические изменения в клетках миокарда: потеря органелл, нарушение структуры и начало апоптоза. Зафиксирован рост уровня воспалительных маркеров, таких как интерлейкин-6 и TNF-α [U+1D6FC], что свидетельствует о активации воспалительного ответа.

Выводы. Окислительный стресс и митохондриальная дисфункция играют ключевую роль в ишемическом повреждении миокарда. Недостаток антиоксидантной защиты усугубляет процесс, делая поиск терапевтических подходов к снижению окислительного стресса при ишемии миокарда актуальным направлением исследований.

ФМ24. Модуляция молекулярных и поведенческих нарушений агонистами PPAR в модели височной эпилепсии

А.Р. Харисова (*adeliaharisova.ah@gmail.com*)¹, Д.С. Сияк¹, О.Е. Зубарева¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Эпилепсия - распространенное неврологическое заболевание, патогенез которого связывают с дисбалансом возбуждающих и тормозных процессов в нейронных сетях. Существующее лечение неэффективно для 30% пациентов, что подчеркивает необходимость разработки новых терапевтических подходов. В последние годы обсуждается роль в эпилептогенезе процессов нейровоспаления, где ключевую роль играют цитокины, нейротрофические и защитные белки, выделяемые активированными астро- и микроглией. Потенциальными средствами, способными регулировать экспрессию генов данных белков, считаются лиганды рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPAR α , β/δ , γ). В моделях эпилепсии показаны противовоспалительные свойства агонистов PPAR α (фенофибрат) и PPAR γ (пиоглитазон), но эффекты активации PPAR β/δ изучены недостаточно.

Методы. В данной работе исследовалось влияние агонистов PPAR β/δ (GW0742 и кардарин) на молекулярные и поведенческие изменения, характерные для хронической литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии (TLE). Введение кардарина (в/б, 2,5 мг/кг) либо GW0742 (в/б, 5 мг/кг) осуществлялось ежедневно в течение недели после индукции модели самцам крыс Вистар. Поведенческие тесты проводились в латентный (лечение GW0742) или хронический (лечение кардарином) периоды модели. Экспрессию генов астро- и микроглиальных белков, вовлеченных в регуляцию нейровоспаления (*Gfap*, *Aif1*, *Il1b*, *Nlrp3*, *Il1rn*, *Lcn2*, *Ptx3*, *S100a10*, *Gbp2*, *Nos2*, *Arg1*), анализировали методами ОТ-ПЦР в реальном времени (мРНК) и вестерн-блоттинга (белки IBA1 и GFAP) в клетках гиппокампа и височной коры.

Результаты. Показано, что в латентную фазу TLE GW0742 подавлял гиперактивность в тесте Открытое поле, а на молекулярном уровне уменьшал экспрессию проэпилептогенного белка *Lcn2* и ослаблял повышенную экспрессию генов *Aif1* и *Gfap*, что свидетельствует о снижении микро- и астроглиоза. Кардарин в хронический период модели ослаблял тревожность, нарушения исследовательского поведения и памяти у TLE крыс. Препарат усиливал экспрессию гена *S100a10*, связанного с нейропротекторной функцией астроцитов. Оба препарата стимулировали экспрессию гена ростового фактора *Fgf2*.

Выводы. Таким образом, полученные данные демонстрируют, что агонисты PPAR β/δ способны модулировать поведенческие и молекулярные нарушения, связанные с эпилептогенезом.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №24-15-00293

ФМ25. Интраназально вводимый инсулин как перспективный препарат при церебральной ишемии, сочетанной с сахарным диабетом 2 типа

Е.Е. Черненко (llystdi@gmail.com)¹, Д.К. Аврова¹, И.И. Зорина¹

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Россия, г. Санкт-Петербург*

Введение. Инсулин, поступающий в ЦНС из кровотока, регулирует пищевое поведение и функции нервной ткани, действуя как нейрогормон. Дефицит инсулина в ЦНС, показанный при сахарном диабете 2 типа (СД2), усиливает повреждение нервной ткани при ишемии, и восстановление его уровня при центральном введении может оказывать положительный эффект. В клинике показано, что интраназально вводимый инсулин (ИВИ) эффективен при нейродегенеративных заболеваниях без системных побочных эффектов, но его действие при ишемии мозга практически не изучено. Цель исследования — изучить нейропротекторное и противовоспалительное действие ИВИ при ишемии мозга СД2-крыс.

Методы. СД2 моделировали на самцах крыс Вистар (2 мес.) с помощью высокожировой диеты и инъекции 20 мг/кг стрептозотоцина. Через 20 недель отбирали крыс с признаками СД2 для индукции двухсосудистой ишемии переднего мозга с гиповолюметрической гипотензией, для чего проводили окклюзию обеих общих сонных артерий в течение 10 мин с дальнейшей 7-ми дневной реперфузией (ИР). В качестве контроля использовали ложно-оперированных крыс (ЛО), которым не проводили гипотензию и окклюзию. ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса вводили через 2 ч после окончания ишемии и далее 1 раз/сутки. На 3 сут. оценивали содержание $\text{TNF}\alpha$ в крови методом ИФА и уровень постпрандиальной глюкозы. На 7 сут. В гиппокампе оценивали экспрессию генов (RT-ПЦР) и количество клеток (окрашивание по Нисслю).

Результаты. Животные с СД2 демонстрировали повышенную массу тела, нарушенную толерантность к глюкозе по данным глюкозо-толерантного теста и рост уровня $\text{TNF}\alpha$, указывающий на воспаление. У СД2-ИР-крыс обнаружено снижение количества клеток в СА1-области гиппокампа, увеличение экспрессии генов белков GFAP и IBA-1, маркеров астроцитов и микроглии, соответственно, что свидетельствует о развитии астроглиоза и микроглиоза. ИВИ предотвращал гибель клеток, снижал экспрессию генов белков GFAP и IBA-1. ИВИ снижал повышенный уровень $\text{TNF}\alpha$, оказывая противовоспалительный эффект. Уровень постпрандиальной глюкозы у СД2-крыс, получавших ИВИ, снизился к 7-му дню с 7.9 ± 0.1 до 6.8 ± 0.1 ммоль/л ($p < 0.05$).

Выводы. Впервые показано, что ИВИ эффективен при его использовании после индукции ишемии при СД2: обнаружены улучшение толерантности к глюкозе, противовоспалительное и нейропротекторное действие.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-75-01083.

ФМ26. Внутриклеточный механизм созревания нейротрофина мозга доминирует в зрелых нервно-мышечных синапсах мыши и обеспечивает сочетанное ретроградное действие BDNF и его продомена

Е.И. Шепелёв (shepelyove@yandex.ru)¹, А.И. Молчанова¹

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

Введение. Нейротрофин мозга (BDNF) известен в том числе как миокин, выделяемый мышечными волокнами при их активности. Созревание (BDNF) может происходить за счет внутри- или внеклеточного протеолиза проBDNF с образованием BDNF и его продомена. BDNF (1 нМ) активирует рецепторы TrkB потенцирует нервно-мышечную передачу увеличивая размер квантов АХ. Продомен BDNF (1 нМ) является его функциональным антагонистом в зрелых моторных синапсах и тормозит нервно-мышечную передачу.

Целью работы было выяснить доминирующий путь созревания BDNF и какие из продуктов его созревания присутствуют и функционируют при выбросе эндогенного BDNF вызванного активацией постсинаптических PAR1 рецепторов.

Методы. Внутриклеточно регистрировали в моторных синапсах диафрагмы мыши спонтанные (миниатюрные) и многоквантовые, вызванные стимуляцией моторных аксонов (50 Гц, 1 с) потенциалы концевой пластинки – МПКП и ПКП, соответственно.

Результаты. Агонист PAR1 TFLLR-NH2 (1 мкМ) увеличивал амплитуду МПКП, что предотвращалось ингибированием везикулярного транспортера АХ, подтверждая ретроградное действие эндогенного BDNF, увеличивающего размер квантов АХ. TFLLR-NH2 при ингибировании р75-рецепторов для продомена LM11A31 увеличивал амплитуду и частоту МПКП, аналогично действию экзогенного BDNF. Блокатор MMP-3 NNGH (10 мкМ) не влиял на параметры МПКП и ПКП и не предотвращал PAR1-опосредованное возрастание амплитуд МПКП. Ингибирование *in vitro* (2 часа) фурина BOS-318 (0,5 мкМ) не предотвращало вызываемое TFLLR-NH2 увеличение амплитуд МПКП. При введении BOS-318 (10 мг/кг перорально) за сутки до эксперимента TFLLR-NH2 не увеличивал размер квантов АХ, что может говорить о выделении проBDNF в таких условиях, и позволяет предположить наличие постсинаптического пула предсформированного миокина.

Выводы. В совокупности, результаты говорят о доминировании в зрелых моторных синапсах внутриклеточного процессинга BDNF, что определяет возможность совместного действия эндогенного BDNF и его продомена при активации PAR1.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №24-25-00073

ФМ27. Влияние введения бактериального липополисахарида на поведение и метаболизм серотонина в мозге мышей с нокаутом гена, кодирующего фосфатазу STEP.

А.С. Щербакова (*a.shsherbakova1@g.nsu.ru*)¹, С.Н. Адонина², Д.В. Базовкина²

¹Факультет естественных наук НГУ, Россия, Новосибирск

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. Стриатумспецифичная протеинтирозинфосфатаза STEP является важным фактором нейропластичности и участвует в патогенезе когнитивных нарушений, ряда психических и неврологических расстройств, включая болезни Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона. Было показано, что ингибитор STEP влияет на серотониновую (5-НТ) систему мозга, дисфункция которой также наблюдается при многих нейродегенеративных и психических заболеваниях. Однако роль STEP в механизмах нейровоспаления до сих пор мало исследована.

Методы. Целью было изучение эффектов длительного (6 дней, 1 мг/кг, i.p., контрольные группы получали физ. раствор) введения бактериального липополисахарида (ЛПС), вызывающего нейровоспаление, на поведение и метаболизм серотонина в мозге мышей с нокаутом гена *Ptprn5*, кодирующего фосфатазу STEP. Эксперименты проводили на самцах линии *Ptprn5* KO и родительской линии C57BL/6 (дикий тип). Поведение изучали в тестах “открытое поле”, “трехкамерный тест”, “распознавание нового объекта”, “подвешивание за хвост”. Содержание 5-НТ и его метаболита 5-ГИУК оценивали с помощью ВЭЖХ. Анализ данных проводили двухфакторным дисперсионным анализом ANOVA с последующим межгрупповым сравнением по Фишеру.

Результаты. Введение ЛПС снижало двигательную активность мышей обеих линий ($p < 0,05$ для C57BL/6 и $p < 0,001$ для *Ptprn5* KO) в тесте “открытое поле”. Однако в “трехкамерном тесте” введение ЛПС приводило к статистически значимому снижению индекса предпочтения социального объекта только у мышей дикого типа ($p < 0,01$). Также введение ЛПС обусловило повышение времени депрессивноподобного замирания в тесте “подвешивание за хвост” только у мышей дикого типа ($p < 0,05$). ЛПС не повлиял на когнитивные функции в тесте “распознавание нового объекта” у животных обеих линий. Длительное введение ЛПС привело к снижению уровня 5-ГИУК во фронтальной коре ($p < 0,05$) и повышению индекса метаболизма серотонина (5-ГИУК/5-НТ) в гиппокампе мышей дикого типа ($p < 0,05$), но не нокаутных животных ($p > 0,05$).

Выводы. Таким образом, дефицит фосфатазы STEP модулирует эффекты ЛПС на поведение и метаболизм 5-НТ в структурах мозга мышей.

Секция: Биотехнология



BT1. Разработка способа получения мелкодисперсного скаффолда-биомиметика внеклеточного матрикса из децеллюляризованной селезенки свиньи

А.А. Ванюкова (algermon1604@gmail.com)^{1,2}, Л.А. Кирсанова¹, Н.В. Баранова¹, А.С. Пономарева¹

¹*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Россия, Москва*

²*ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Россия, Москва*

Введение. Получение биоматериалов из децеллюляризованных органов – перспективное направление в регенеративной медицине. Процесс децеллюляризации направлен на разрушение клеток и удаление их остатков из ткани с сохранением компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ). ВКМ селезенки обладает уникальной 3D-структурой и богатым составом. Целью работы была разработка способа получения мелкодисперсного скаффолда-биомиметика ВКМ из децеллюляризованной селезенки свиньи (ДецС).

Методы. Процесс получения ДецС включал циклы замораживания/оттаивания, измельчение, последовательную обработку гипотоническим и гипертоническим растворами и раствором фосфатно-солевого буфера (PBS). Все растворы содержали 0,1% додецилсульфата натрия (SDS). В завершении детергенты удаляли раствором PBS с антибиотиком-антимикотиком. Обработку ткани растворами проводили в условиях постоянного перемешивания. Эффективность процесса децеллюляризации оценивали гистологическими методами, а также исследовали цитотоксичность скаффолда на культуре клеток NIH/3T3, используя флуоресцентный краситель LIVE/DEAD.

Результаты. Гистологическая картина скаффолда была представлена соединительнотканными тяжами фрагментов трабекул и капсулы с участками прилежащей тонкой стромы и минимальным содержанием обломков эритроцитов. При окрашивании по методу Массона в скаффолде визуализировались синие коллагеновые волокна. Данные гистологического анализа подтвердили эффективность выбранного способа децеллюляризации. При исследовании цитотоксичности образцов скаффолда через 24 часа контакта выявили более 90% жизнеспособных фибробластов с зеленой флуоресценцией, что свидетельствовало об отсутствии цитотоксического действия скаффолда.

Выводы. Разработан способ получения мелкодисперсного скаффолда-биомиметика ВКМ из ДецС, обладающего потенциалом для применения в регенеративной медицине. Перспективы дальнейших исследований включают оптимизацию состава и способов формирования тканеинженерных конструкций на основе данного скаффолда и внедрение их в клиническую практику.

БТ2. Разработка нанокapиллярного сенсора для определения глюкозы

Е.Н. Верховникова (kateverkhovnikova@mail.ru)

Лаборатория биофизики, НИТУ МИСИС, Россия, Москва

Введение. Контроль уровня глюкозы в крови важен для людей с сахарным диабетом. Принцип работы основан на электрохимической реакции, где глюкозооксидаза катализирует окисление глюкозы. Цель работы: разработка нанокapиллярного сенсора для определения глюкозы.

Методы. 1. АСМ: Методика иммобилизации фермента была воспроизведена на поверхности слюды. Листы слюды были силанизированы APS. Далее её погружали в 2,5%-ный раствор ГА. Затем образцы опускали в раствор глюкозооксидазы (2 мг/мл) на ночь. На каждом этапе модификации топография поверхности была исследована методом АСМ., **2. Модификация нанокapилляра:** Данная методика была воспроизведена на внутренней поверхности нанокapилляра. На каждом этапе модификации были записаны ЦВ в HBSS от -800 до +800 мВ, 400 мВ/с., **3. Изготовление нанокapилляров:** Для создания нанокapиллярных электродов кварцевые трубки вытягивались на лазерном пуллере. Диаметр отверстия нанокapилляра 60-500 нм., **4. Изготовление углеродного нанoeлектрода:** Пиролитический углерод осаждали путем термического разложения пропан-бутановой смеси в инертной атмосфере. Термическую обработку проводили газовой горелкой. **5. Изготовление платинового нанoeлектрода:** Для травления углерода электрод погружали в водный раствор 0,1 М NaOH и 10 М KCl (0-2,2 В). Далее на электрод осаждали платину в 2 М растворе H₂PtCl₆ (-1,2-0 В)., **6. Химическая модификация электрода:** Сначала функционализировали поверхность -NH₂ с помощью APS, в качестве сшивающего агента использовали глутаровый альдегид для связи GOx с электродом., **7. Измерение глюкозы:** Для количественного определения глюкозы в растворе был использован метод ЦВА. Сначала измерение тока проводили в чистом PBS для определения фонового тока. Далее добавлялись аликвоты глюкозы от 1 мМ до 10 мМ и был оценен ток методом ЦВ (-800 мВ до +800 мВ, 400 мВ/с).

Результаты. 1. Оценка топографии поверхности слюды методом АСМ

Топография поверхности меняется по мере модификации поверхности., **2. Иммобилизация GOx на внутренней поверхности нанокapилляра:** После реакции кварца с APS на поверхности образуются аминогруппы, которые в растворе электролита протонируются, ионный ток при положительных потенциалах увеличился. При сшивке с глутаровым альдегидом ток уменьшается, так как карбонильные группы связываются с аминогруппами APS. После функционализации GOx на ЦВ видно отрицательное выпрямление тока.

Выводы. Таким образом, разработан наносенсор для определения глюкозы на клеточном уровне.

БТ3. Влияние нокаута гена *StPAIN-1* технологией CRISPR/Cas9 на содержание углеводов в клубнях картофеля *S. tuberosum*

М.К. Волков (volkovmk03@gmail.com)^{1,2}, А.Д. Антипов¹, А.С. Трофимов¹, В.Д. Карлов¹

¹Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Россия, Москва

²РТУ МИРЭА, Институт тонких химических технологий, Россия, Москва

Введение. После сбора урожая клубни картофеля *S. tuberosum* хранят при температурах ниже 10°C для предотвращения прорастания, сморщивания и развития болезней. В результате возникающего холодового осахаривания происходит накопление восстанавливающих сахаров – глюкозы и фруктозы, значительно ухудшающих товарные качества клубней. При обжарке таких клубней образуются продукты реакции Майяра – реакции между восстанавливающими сахарами и аминокислотами – придающие картофелю тёмно-коричневую окраску и горький вкус. Одним из продуктов реакции Майяра является канцероген акриламид. Основной вклад в развитие холодового осахаривания вносит фермент вакуолярная инвертаза VInv, гидролизующий сахарозу. Ранее было показано, что инактивация гена *StPAIN-1*, кодирующего VInv, значительно повышала потребительские качества обжаренного картофеля.

Методы. Нами были подобраны гидовые РНК к гену *StPAIN-1* и клонированы в вектор pKSE401. Экспланты *S. tuberosum* сорта Фрителла были трансформированы агробактерией *A. tumefaciens* AGL0, несущей вектор pKSE401. Участки гена *StPAIN-1*, содержащие мишени для Cas9, были амплифицированы для оценки эффективности редактирования с помощью секвенирования на платформе Illumina. Клубни трансгенных линий в течение 2 месяцев хранились при температуре 2-4°C. Содержание крахмала, сахарозы, глюкозы и фруктозы в клубнях проводилось с помощью ферментативного анализа. Ломтики клубней обжаривались в растительном масле для оценки цвета чипсов.

Результаты. Среди 79 трансгенных растений 49% содержали нокаут всех аллелей гена *StPAIN-1*. Среднее значение содержания крахмала в отредактированных линиях и контрольной составило 134,5±17,5 мг/100г сырого веса клубня (СВ) и 132,8±11,5 мг/100г СВ, соответственно. Значительные отличия были отмечены при сравнении средних величин содержания сахарозы 21,9±2,8 мг/г СВ, глюкозы 0,39±0,19 мг/г СВ и фруктозы 0,075±0,073 мг/г СВ в отредактированных линиях против величин содержания сахарозы 4,16±1,3 мг/г СВ, глюкозы 5,91±0,72 мг/г СВ и фруктозы 3,94±1,21 мг/г СВ в контрольной линии. Чипсы из линий картофеля, содержащих нокаут *StPAIN-1*, были значительно светлее контроля.

Выводы. При помощи технологии CRISPR/Cas9 получены трансгенные растения картофеля с нокаутом гена *StPAIN-1*, устойчивые к холодовому осахариванию.

БТ4. Оптимизация диагностической платформы на основе нуклеазы CcCas9 для выявления мутации H275Y вируса гриппа

А.А. Горьковская (*gorkovskaya_aa@spbstu.ru*)^{1,2}, А.А. Васильева¹, М.А. Ходорковский¹

¹СПбПУ Петра Великого, Россия, Санкт-Петербург

²Университет ИТМО, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Существующие стратегии борьбы с гриппом включают противовирусные препараты, такие как осельтамивир, однако мутации в гене нейраминидазы могут вызывать устойчивость к нему. Системы CRISPR-Cas являются перспективным направлением диагностики мутаций. Цель работы — разработка диагностической системы на основе CcCas9 для выявления мутации H275Y гена нейраминидазы вируса гриппа H1N1. На предыдущем этапе показана возможность её применения: при отсутствии мутации происходит расщепление ДНК, при наличии — нет. Настоящий этап сосредоточен на подборе универсальной смеси направляющих crРНК, обеспечивающей специфичность CcCas9 к различным штаммам гриппа. Также изучаются оптимальные условия *in vitro* для эффективного расщепления ДНК-мишеней, способные повысить универсальность диагностической платформы.

Методы. Синтез направляющих РНК выполняли с использованием набора для *in vitro* транскрипции HiScribe SP6 (NEB) после подготовки ДНК-матрицы с соответствующим промотором. Реакции *in vitro* расщепления ДНК проводили при 40°C. Анализ проводили гель-электрофорезом в агарозном геле.

Результаты. Проведен анализ наиболее часто встречающихся вариантов региона, окружающего мутацию H275Y. Оптимизация длины спейсера crРНК показала, что сокращение его до 18 нуклеотидов уменьшает число вариантов до 10, сохраняя эффективность расщепления CcCas9. Созданы искусственные ДНК-мишени, имитирующие 10 вариантов региона, что позволило проверить универсальность разработанной диагностики. Оптимизированы условия *in vitro* для расщепления ДНК-мишеней: наилучшее соотношение компонентов реакции — 1200 nM CcCas9, 300 nM каждой crРНК в смеси. Разработана смесь crРНК, обеспечивающая высокую специфичность CcCas9 к различным вариантам вируса. Показано, что разработанная система эффективно расщепляет ДНК дикого типа, тогда как в случае наличия мутации H275Y расщепление не происходит, что подтверждает ее специфичность.

Выводы. Оптимизирована работа нуклеазы CcCas9 для диагностики мутации H275Y. Сокращение спейсера crРНК сохранило эффективность расщепления и уменьшило число мишеней до 10. Подобрана смесь из 5 crРНК, специфичных к диким штаммам, без активности к мутантам. Планируется интеграция qPCR для детекции.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации No FSEG-2023-0014

БТ5. Пористый каркас для тканевой инженерии хрящевой ткани

Е.А. Гусева (*ekaterinaa.guseva.2001@mail.ru*)^{1,2}, А.Д. Белова², А.М. Григорьев², Е.А. Немец²

¹РТУ МИРЭА, Россия, Москва

²ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, Россия, Москва

Введение. Лечение остеоартроза представляет собой сложную задачу, поскольку заболевание часто сопровождается прогрессирующим разрушением суставных тканей, хроническим болевым синдромом и ограничением подвижности. Современные подходы к лечению направлены на формирование сложной архитектуры естественных тканей с помощью тканеинженерных конструкций. Цель исследования создание материалов для регенерации хряща, сочетающих пористую структуру, механическую прочность и способность поддерживать взаимодействие с клетками.

Методы. Децеллюляризацию микрочастиц хрящевой ткани свиньи проводили при комнатной температуре в трех сменах фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего 0,1% додецилсульфат натрия и повышающуюся концентрацию Triton X-100 (1-3%), с дополнительным воздействием ультразвука. Продукт ферментативной деградации (ПФДх) получали обработкой лиофилизованного децеллюляризованного хряща в растворе пепсина в течение 24 часов при комнатной температуре. Плоские пористые каркасы (ППК) изготавливали методом электроспиннинга на установке NANON-01A из раствора в гексафтоизопропанолe поликапролактона (ПКЛ) с добавлением лиофилизованного ПФДх (10% и 30% по весу полимера).

Результаты. Сканирующая электронная микроскопия для всех типов каркасов подтвердила формирование пористой структуры с размерами волокон от сотен нм до 1-2 мкм и пор с размером, достаточным для инфильтрации клеток в объем каркаса. Композит с добавлением 10% ПФДх обладает максимальной прочностью $6,30 \pm 0,96$ Н, по сравнению как с чистым ПКЛ, так и образцом, содержащим 30% ПФДх. При культивировании *in vitro* хондроцитов было обнаружено, что добавление 10% ПФДх к ПКЛ значительно повышало адгезию и пролиферацию клеток. В группе ПКЛ с добавлением 30% ПФДх на 7 сутки культивирования наблюдается менее равномерное распространение клеток по поверхности, кроме того, отмечалось большее количество мертвых клеток.

Выводы. Композитные каркасы из ПКЛ с добавлением 10% ПФДх обладают высокопористой структурой, достаточной механической прочностью и способны поддерживать адгезию и пролиферацию хондроцитов, что делает их перспективными для разработки имплантатов хрящевой ткани в регенеративной медицине.

БТ6. Создание тканеинженерного конструкта методом электроформования с биокomпонентами для регенерации скелетных мышц

Е.А. Иванцова (ivantsova2304@gmail.com)

Научно-образовательная лаборатория тканевой инженерии и регенеративной медицины НИТУ МИСИС, Россия, Москва

Введение.

При объемной потере мышечной массы эндогенная регенерация скелетных мышц за счет активации миосателлитов невозможна. Разработка тканеинженерных конструкций, направляющих миогенную дифференцировку и обеспечивающих формирование миофибрилл в трехмерной среде, является перспективным подходом для лечения мышечных травм. Инновационным способом получения анизотропных тканеинженерных скаффолдов с биокomпонентами является электроформование полимеров с инкапсулированными сфероидными клетками.

Методы. Сфероиды диаметром 160 мкм были сформированы из клеточной линии крысиных миобластов L6 при использовании агарозных микро-молдов. Полимерные нано- и микрофибриллы были получены на установке Super ES-2 методом электроформования. Оценка жизнеспособности и пролиферации клеток *in vitro* была проведена при использовании флуоресцентных красителей с помощью системы визуализации клеток EVOS M5000. Для исследования морфологии и структуры электроформованных скаффолдов был применен сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) Tescan Vega 3.

Результаты. Было осуществлено коаксиальное электроформование, в процессе которого через внутреннюю иглу подавался полиэтиленоксид (ПЭО) со сфероидными клетками, а через внешнюю — коллаген. Параллельно проводилось электроформование сополимера лактида и гликолида (ПЛА) для достижения необходимой механической прочности скаффолда. Полученные тканеинженерные конструкты с анизотропной структурой были погружены в DMEM и оставлены при температуре 37 °C в течение двух недель для исследования миграции клеток из сфероидов и их пролиферации внутри матрикса. Анализ жизнеспособности клеток проводился сразу после электроформования, через 7 и 14 дней культивирования матрикса. В результате взаимодействия с матрицей сфероиды анизотропно распластались в виде выровненных микро-структур.

Выводы. 1. Получен тканеинженерный конструкт путем параллельного электроформования ПЭО, содержащего инкапсулированные сфероиды, коллагена и ПЛА. 2. Выявлено методом СЭМ, что анизотропность и целостность конструкта сохраняется после 2-недельной инкубации в культуральной среде при 37°C. 3. Проведен качественный анализ жизнеспособности и пролиферативной активности клеток сразу после электроформования, а также через 7 и 14 дней культивирования, который продемонстрировал эффективную миграцию клеток из сфероидов на волокна матрикса и их активную пролиферацию.

BT7. Биосенсор фенолов на основе композита из пиррола, термообработанного полиакрилонитрила и рекомбинантной тирозиназы

К.М. Каретова (karetova.ksenia@mail.ru)¹, Д.О. Осипов^{2,3}

¹Институт новых материалов, НИТУ МИСИС, Россия, Москва

²НИТУ МИСИС, Россия, Москва

³Лаборатория биотехнологии ферментов, ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва

Введение. С развитием технологий все больше внимания уделяется разработке недорогих, простых в изготовлении, чувствительных, точных и портативных датчиков, в частности биосенсоров. Целью работы была разработка прототипа ампероматрического биосенсора (ПБ) фенольных соединений. Для его получения использовали рекомбинантную тирозиназу (КФ 1.14.18.1) *Aspergillus oryzae*, экспрессированную в грибе *Penicillium verruculosum*, которую иммобилизовывали на стеклоуглеродном электроде модифицированном полипирролом и термически обработанным полиакрилонитрилом.

Методы. Электрохимическая платформа для фермента создавалась в несколько этапов. Сначала проводили электрополимеризацию пиррола на поверхности стеклоуглерода, затем наносили суспензию термически обработанного полиакрилонитрила, а на последнем этапе – раствор фермента в фосфатном буфере. Электрополимеризацию и оценку проводящих свойств ПБ на каждом этапе выполняли с помощью циклической вольтамперометрии в трех-электродной ячейке.

Результаты. Окислительно-восстановительные реакции являлись процессом, контролируемым диффузией на поверхности электрода, о чем свидетельствовали линейные зависимости пиковых анодных и катодных токов от квадрата скорости сканирования, что типично для таких систем. Постоянная Михаэлиса-Ментен составила 0,09 мМ для катехола и 0,14 мМ для п-ванилина, что указывает на высокое сродство тирозиназы к субстратам и согласуется с ранее опубликованными данными для тирозиназ. Изготовленный ПБ имел высокую чувствительность ($385,8 \text{ мкА} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$) и широкий линейный динамический диапазон (0,09 мМ-1,2 мМ) для катехола. Для п-ванилина эти значения составили $441,7 \text{ мкА} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ и 0,2 мМ-0,6 мМ соответственно.

Выводы. Изготовленный ПБ имеет удовлетворительные значения постоянной Михаэлиса-Ментен, чувствительности и линейного динамического диапазона, а значит может быть использован в качестве биосенсора для качественного и количественного определения некоторых фенольных соединений: катехола и п-ванилина.

BT8. Создание мутантного штамма PY79 клеток *Bacillus subtilis* с повышенной продукцией липопептидного ПАВ сурфактина

Е.Ю. Линдин (11lindin@mail.ru)¹, В.С. Трефилов¹, Е.А. Кубарева²

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

²НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Сурфактин – циклический гептапептид, этерифицированный жирной кислотой, востребованное биологическое поверхностно-активное вещество, синтезируемое бактериями рода *Bacillus*. Основной фермент биосинтеза сурфактина – сурфактинсинтетаза, кодируемая опероном *srfA*, для активации биосинтеза сурфактина необходим белок Sfp. Штамм PY79 не способен к синтезу сурфактина из-за мутации в гене *sfp*. Мы предлагаем новый способ стимуляции биосинтеза сурфактина в клетках *B. subtilis* посредством малых некодирующих 6S-1 и 6S-2 РНК. Объекты исследования - клетки штамма PY79 и его производные с нокаутом генов 6S РНК.

Цель работы: 1) исследование влияния 6S-1 и 6S-2 РНК на транскрипцию генов оперона *srfA*; 2) восстановление синтеза сурфактина в клетках штамма PY79.

Методы. кПЦР с ОТ, колориметрический метод определения количества сурфактина, валидация ВЭЖХ, методы генетической инженерии

Результаты. С помощью набора делеционных мутантов показано, что 6S РНК участвуют в регуляции биосинтеза сурфактина в клетках *B. subtilis* PY79. Делеция гена 6S-1 РНК, но не гена 6S-2 РНК, и двойная делеция генов обеих 6S РНК приводит к повышению эффективности транскрипции оперона *srfA* в поздней стационарной фазе роста (28 ч) примерно в 3 раза. На экспрессионной плазмиде рНТ01 был внесен интактный ген *sfp* из штамма NCIB 3610 в компетентные клетки *B. subtilis* PY79 дикого типа. Количество сурфактина, синтезируемого ими, - 147 мг/л среды (24 ч), что в 1,4 раза больше синтезируемого сурфактина клетками NCIB 3610 (110 мг/л). Проводятся эксперименты по восстановлению сурфактин-продуцирующей активности в делеционных клетках с нокаутом гена 6S-1 РНК, а также исследование изоформного состава продуцируемого сурфактина.

Выводы. 1. Делеция 6S-1 РНК, но не 6S-2 РНК, приводит к увеличению эффективности транскрипции оперона *srfA* в штамме PY79.

2. Получены трансформированные клетки *B. subtilis* PY79 дикого типа с восстановленной сурфактин-продуцирующей активностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект №24-24-00193.

БТ9. Получение рекомбинантных алергокомпонентов Ole e 2, Ole e 3

А.Д. Лукашевичус (*stasyuk12@mail.ru*)¹, А.М. Винцевская¹, Лаборатория
иммунопатологии, ПМГМУ имени И.М. Сеченова, Россия, Москва

Введение. Алергены Ole e 2 и Ole e 3 являются минорными компонентами пыльцы *Olea europaea*, но играют важную роль в перекрестных аллергических реакциях у sensibilized пациентов. Цель работы заключалась в создании рекомбинантных алергенов для их дальнейшего использования в новой диагностической системе – Алергочип РФ.

Методы. В работе использовали векторы pET27b с сайтами рестрикции NdeI/XhoI для клонирования синтетических генов *Ole e 2*, *Ole e 3*. После трансформации *E. coli* XL1-Blue наращивали плазмиды, затем вводили их в экспрессионный штамм *E. coli* BL21 GOLD (DE3) для синтеза белков. Клоны культивировали в 400 мл среды SB с канамицином до 1,0-1,2 OD, индуцировали экспрессию ИПТГ (1 mM) и инкубировали при 18°C в течение 19 часов. Клетки центрифугировали, ресуспендировали в 25 мл буфера (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM имидазола, pH 8), обрабатывали лизоцимом 20 минут на льду, дезинтегрировали ультразвуком (10-секундные циклы, 200 Вт) и снова центрифугировали. Очистку белков проводили металл-хелатной аффинной хроматографией на Ni-NTA. Наличие целевых белков подтверждали электрофорезом в ПААГ, затем проводили диализ в буфере 50 mM HEPES, pH 8,5, 0.1 M KCl

Результаты. Успешно получены и очищены рекомбинантные белки *Olea europaea* с использованием прокариотической системы *E. coli*. Их идентификация проведена методом ПААГ-электрофореза. Чистота полученных белков составила около 85%.

Выводы. Оливковое дерево - распространенный аллерген среди пациентов с перекрестными реакциями. Включение этих алергенов в диагностическую панель Алергочипа РФ обеспечит более точную и безопасную диагностику пациентов с аллергическими реакциями.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-75-30016

BT10. Методический подход для выявления пьезоэффекта на поверхности полимерного материала в условиях биологического эксперимента по адгезии бактерий с использованием *Lactobacillus fermentum*

П. Д. Лукина (Lukinapd@yandex.ru)¹, А. Л. Николаев², А. П. Бонарцев¹, В. В. Воинова¹

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

²Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Пьезоэлектрический эффект в коллаген-содержащих тканях (кости, хрящи) стимулирует разработку биомиметических материалов и электроактивных полимеров для медицины. Наша группа создает биосовместимые и биodeградируемые полимеры на основе поли-3-оксибутирата (ПОБ), обладающего пьезоэлектрическими свойствами, близкими к коллагену. Пьезоэффект в ПОБ обусловлен генерацией заряда при механической деформации. Изучение этого эффекта требует электромеханического сопряжения.

Методы. Для создания электромеханического сопряжения применяются ультразвуковые (УЗ) излучатели или воздействие переменным магнитным полем (ПМП) на магнитоактивные компоненты. Возникающее механическое напряжение передается полимерной матрице. Адгезия бактерий использовалась как индикатор пьезоэлектрической активности. Адгезия оценивалась путем окрашивания бактерий кристаллическим фиолетовым с последующей экстракцией красителя и измерением оптической плотности экстракта при 565 нм.

Результаты. В первой серии экспериментов использовалась УЗ-установка (2,6 МГц). ПОБ-пленки, помещенные в суспензию *L. fermentum* (37°C, 0,1 Вт/см², 13 Гц), показали снижение адгезии бактерий в 2,6 раза по сравнению с контролем. Адгезия к полипропилену, не обладающему пьезоэлектрическими свойствами, осталась неизменной. Во второй серии применялась установка, генерирующая ПМП (0,67 Гц, 68 мТ). В чистом ПОБ пьезоэффект не наблюдался. Однако в композите ПОБ/М, содержащем наночастицы магнетита, под действием ПМП адгезия *L. fermentum* снизилась в 1,7 раза.

Выводы. Разработанный методический подход, основанный на оценке изменения адгезии бактерий, позволяет качественно определять пьезоэлектрический эффект полимерных материалов в условиях биологического эксперимента.

BT11. Расщепляющие глютен протеазы микромицетов рода *Aspergillus*

В.М. Лямина (lyaminavt@mail.ru)¹, А.К. Ажбол¹

¹Кафедра микробиологии, биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Целиакия - наиболее распространенное наследственное и неизлечимое воспалительное заболевание у людей, вызываемое продуктами питания. Симптомы проявляются при употреблении глютена, содержащегося в злаках. Строгая безглютеновая диета - единственная эффективная мера контроля заболевания. В связи с этим актуален поиск глютенразлагающих препаратов. Существует небольшое количество препаратов, основанных на пролин- и глутамин-специфичных эндопептидазах. В качестве продуцентов выступают рекомбинантные штаммы бактерий и микромицеты. В частности, у представителей рода *Aspergillus* отмечена секреция глютеназ.

Методы. С помощью баз данных NCBI и BRENDA, инструмента Protein BLAST были выявлены представители с ферментами, наиболее вероятно обладающими глютенолитической активностью.

Глубинное культивирование проводилось в течение 12 суток в колбах Эрленмейера при постоянном перемешивании, в среде с глютенем в качестве индуктора секреции глютенолитических протеаз. Активности гидролиза глютена и общая протеолитическая оценивались по результатам спектрофотометрии реакционных смесей после проведения ферментативных реакций культуральных жидкостей с глютенем и азоказеином, соответственно.

Зимография проводилась в двух вариациях состава разделяющего геля: с глютенем и желатином.

Результаты. В результате биоинформатического анализа виды *Aspergillus carbonarius*, *A. flavus*, *A. tubingensis* были определены как способные секретировать протеазы, наиболее функционально схожие с используемыми в промышленности. При изучении динамики активности глютенлиза при глубинном культивировании *A. flavus* показал наибольшую активность и ранее всего наступающий пик активности, а именно - на 4-ые сутки культивирования. По результатам зимографии у *A. flavus*, в отличие от других видов, на протяжении всего периода культивирования было обнаружено наличие глютенолитических протеаз. Наиболее эффективно гидролизовала глютен протеаза *A. flavus* массой около 250 кДа.

Выводы. Наиболее схожими с глютеназами последовательностями оказались протеазы *Aspergillus carbonarius*, *A. flavus*, *A. tubingensis*. При глубинном культивировании наибольшую активность и ранее всего наступающий ее пик показал *A. flavus*. При проведении зимографии наибольшую эффективность гидролиза глютена показал *A. flavus*.

BT12. Исследование циркулирующей опухолевой ДНК у больных тройным негативным раком молочной железы в процессе первичного лечения (серия наблюдений)

П.С. Мазина (mazina-polina@bk.ru)^{1,2}, И.В. Пронина¹, Т.М. Заварыкина^{1,3}

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

²*Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова РТУ МИРЭА, Россия, Москва*

³*Научный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Минздрава России, Россия, Москва*

Введение. Анализ циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) может стать новым методом оценки эффективности неоадъювантной терапии (НАХТ) при наиболее агрессивном варианте рака молочной железы – тройном негативном подтипе (ТНРМЖ). Уровень цоДНК может иметь прогностическое значение, коррелируя с динамикой опухолевого процесса в период лечения. Целью данной работы было определение концентрации цоДНК в динамике в ходе НАХТ у больных ТНРМЖ и сопоставление полученных данных с выраженностью лекарственного патоморфоза опухоли в серии наблюдений.

Методы. У пациенток с ТНРМЖ до начала НАХТ были собраны образцы опухолевой ткани и цельной крови, образцы плазмы крови собирались: до лечения (Т0), перед 2 (Т1) и 5 (Т2) курсами ХТ, после ХТ перед операций (Т3), после операции (Т4). Из образцов опухолевой ткани и крови была выделена ДНК, из образцов плазмы – внеклеточная ДНК. По результатам полноэкзомного секвенирования пар образцов от каждой пациентки в образце ДНК из опухолевой ткани биоинформатически определяли наиболее частые соматические мутации, отсутствующие в ДНК крови. К выявленным мутациям были подобраны системы праймеры-флуоресцентные зонды для проведения цифровой капельной ПЦР с образцами внеклеточной ДНК и оценки уровня цоДНК.

Результаты. У пациенток с полной патоморфологической регрессией опухоли наблюдалось снижение количества цоДНК к точкам Т2 и Т3 (в некоторых случаях с резким подъемом на начальных этапах лечения). У пациенток, для которых не выявлено достижение полной патоморфологической регрессии, количество цоДНК повышалось в точке Т2 и достигало максимального значения в точке Т3. По полученным данным наиболее информативным временным интервалом для анализа цоДНК представляется Т2-Т3.

Выводы. Уровень цоДНК у больных ТНРМЖ в ходе НАХТ может стать перспективным прогностическим маркером выраженности лекарственного патоморфоза опухоли.

BT13. Разработка системы для направленной интеграции генетических конструкций в заданное место генома с использованием рекомбиназы Vxb1

Т.Е. Миньковская (inquisitive.lizard@gmail.com)^{1,2}, М.В. Шенелев¹

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Россия, Москва

²Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Редактирование геномов млекопитающих с помощью системы CRISPR/Cas9 позволяет создавать генетически модифицированные линии животных и клеток, но нокин больших фрагментов ДНК неэффективен. Альтернативным подходом может стать применение сериновой интегразы Vxb1, катализирующей рекомбинацию между двумя фрагментами ДНК по сайтам attB и attP [1, 2]. Цель работы – адаптация Vxb1 для геномной инженерии в эмбрионах мыши и линиях клеток человека и ее применение для создания клеточной модели для исследования свойств онкогенной ГТФазы RhoV.

Методы. Донорные плазмиды для нокина получали с помощью методов генетической инженерии. Плазмиды для экспрессии Vxb1 с 1-4 NLS создавали на основе плазмиды pCMV-Vxb1 (Addgene #182142). Клетки трансфицировали с помощью реагента GenJect-39 (Molfecta). Анализ клеток производился с использованием проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США).

Результаты. Для тестирования эффективности рекомбиназы Vxb1 с помощью CRISPR/Cas9-опосредованного нокина в новый safe-harbor локус Rg1 создана репортерная клеточная линия HEK293T, несущая ген устойчивости к пуромицину, фланкированный сайтами attP. Получены плазмиды, экспрессирующие интегразу Vxb1 с 1-4 NLS. С помощью нокина в локус AAVS1 получены клоны клеток NCI-H1299 и A549, несущие кДНК флуоресцентного белка LifeAct-mScarlet, фланкированную сайтами attP. Тест эффективности рекомбинации (RMCE) в клонах клеток NCI-H1299 выявил рекомбинацию между геномным локусом и донорной плазмидой, кодирующей ГТФазу RhoV.

Выводы. Разработан набор молекулярных инструментов для Vxb1-опосредованной геномной инженерии в клетках млекопитающих и оценки эффективности рекомбинации. Создана модельная система для RMCE, в которой показана Vxb1-опосредованная рекомбинация.

Литература

1. Li, T., Yang, Y., Qi, H., Cui, W., Zhang, L., Fu, X., et al. (2023) CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. Signal Transduct. Target. Ther., Nature Publishing Group 8, 1–23. 2. Yarnall, M. T. N., Ioannidi, E. I., Schmitt-Ulms, C., Krajcski, R. N., Lim, J., Villiger, L., et al. (2023) Drag-and-drop genome insertion of large sequences without double-strand DNA cleavage using CRISPR-directed integrases. Nat. Biotechnol., Nature Publishing Group 41, 500–512

BT14. Создание высокоэффективного алгоритма интерпретации нелинейных сигналов автофлуоресценции ишемизированной сердечной ткани

Г.С. Пашинцев (goshanto@mail.ru)¹, М.С. Медведев¹, М.М. Слотвицкий¹, В.А. Цвеляя¹

¹*Лаборатория экспериментальной и клеточной медицины, МФТИ, Россия, Москва*

Введение. Ежегодно в мире выполняется около 5.000 операций по трансплантации сердца. Одной из ключевых задач при подготовке к такой операции является оценка пригодности конкретного органа для пересадки после его транспортировки. Длительное нахождение органа в условиях *ex vivo* может привести к ишемии (локальному снижению кровоснабжения), что, в свою очередь, оказывает значительное влияние на выживаемость пациентов после трансплантации. Целью данной работы было разработать метод неинвазивного мониторинга состояния трансплантата.

Методы. Предложен модифицированный подход ED-FRAP (ферментозависимое восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания) для NADH. Выбор NADH в качестве объекта исследования обусловлен его значением в метаболизме и отражением состояния клеток, а также свойством аутофлуоресценции — флуоресценции без дополнительных меток (пик поглощения — 340 нм, пик испускания — 470 нм). Поскольку стационарный сигнал не всегда позволяет однозначно интерпретировать данные, в работе была изучена кинетика фотообесцвечивания. Рассмотрены реакции с участием фермента глутаматдегидрогеназы (GDH), который играет ключевую роль в метаболизме NADH: при недостатке кислорода в ткани активность GDH локально снижается, что может быть использовано для различения ишемизированной и нормальной ткани. Для поиска параметров исследуемого участка ткани использованы прямой перебор, градиентный спуск и нейронные сети, дифференциальные уравнения модели решались методом Рунге-Кутты.

Результаты. Для обработки сигналов был разработан алгоритм, который создает карту распределения активности GDH в области ткани. С целью ускорения работы и повышения универсальности алгоритма было предложено использовать методы машинного обучения. Алгоритм был протестирован на сердцах крыс, подвергшихся ишемии. На основе полученных карт можно четко выделить участки с пониженной активностью фермента.

Выводы. Был создан алгоритм, который позволяет формировать карту распределения активности глутаматдегидрогеназы в тканях. На основе полученных карт удастся четко идентифицировать участки с пониженной активностью фермента, что открывает новые возможности для диагностики и мониторинга состояния тканей.

BT15. Поиск новых танатин-подобных антимикробных пептидов

А.А. Смолина (a.a.stolina003@mail.ru)^{1,2}, Ю.С. Тепловодская^{3,2}, П.В. Пантелеев^{2,3}, Т.В. Овчинникова^{2,3}

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

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

³*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Россия, Долгопрудный*

Введение. Проблема антибиотикорезистентности побуждает нас к поиску новых подходов в лечении бактериальных инфекций. Значительный практический интерес представляют исследования антимикробных пептидов (АМП) благодаря сравнительно меньшей вероятности развития резистентности к данным соединениям у различных бактерий. Танатины — семейство пептидов, первый представитель которого выделен из клопа *Podisus maculiventris*. Ключевыми мишенями данного пептида являются белки-переносчики, входящие в состав Lpt-комплекса, который необходим для биогенеза внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Основное направление данной работы — поиск новых гомологов танатина и исследование спектра их антибактериального воздействия на клинически значимых патогенов.

Методы. Для поиска новых гомологов использовался алгоритм TBFASTN и различные базы данных секвенированных геномов и транскриптомов клопов. Получение и очистку отобранных рекомбинантных пептидов проводили с использованием оптимизированной ранее методики получения бета-шпигелных АМП. Для анализа элементов вторичной структуры полученных пептидов применяли спектроскопию кругового дихроизма. Был проведен скрининг активности и рассчитаны минимальные ингибирующие концентрации (МИК). Для проверки способности пептидов повреждать цитоплазматическую мембрану грамотрицательных бактерий был проведен анализ с использованием о-нитрофенил-β-D-галактозида (ONPG). Цитотоксичность пептидов проверили на мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC) с использованием резазурина. Гемолитическую активность исследовали с использованием эритроцитов путем оценки высвобождения гемоглобина.

Результаты. В результате были обнаружены два новых соединения (Rip-3 и Rip-4) с нетипичной для танатин-подобных АМП структурой. Основной механизм их действия связан с разрушением цитоплазматической мембраны бактерий. Анализ спектра активности выявил высокую селективность антибактериального действия в отношении *Bacillus* и *Mycobacterium* sp.

Выводы. Таким образом, исследование новых танатин-подобных пептидов позволяет расширить спектр их применения.

BT16. Сайт внутреннего связывания рибосом риновируса человека эквивалентен эталонному сайту внутреннего связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV IRES) при экспрессии генов цепей хорионического гонадотропина человека

Д.О. Стронина (dariastronina@gmail.com)¹, М.В. Синегузова¹, И.И. Воробьев¹, Н.А. Орлова¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, Москва

Введение. Внутренний сайт связывания рибосом (IRES) вируса энцефаломиокардита (EMCV) широко используется для ко-экспрессии нескольких белков или нескольких их субъединиц в культивируемых клетках. Включение IRES EMCV в би- и олигоцистронные мРНК обеспечивает высокий уровень трансляционной активности независимо от кэп-структуры. Хотя известны IRES других вирусов с высокой эффективностью реинициирования трансляции, их способность инициировать трансляцию фармацевтически значимых белков изучена недостаточно. Мы предположили, что IRES риновируса человека типа 89 может реинициировать трансляцию α -цепи гликопротеиновых гормонов человека на уровне или лучше, чем IRES EMCV, при этом исключая повтор второго IRES EMCV, необходимого для трансляции селекционного маркера DHFR.

Методы. Была создана генетическая конструкция для экспрессии цепей хорионического гонадотропина человека (ХГч), где IRES для α -цепи – последовательность риновируса человека типа 89, а для маркера DHFR – аттенюированный EMCV IRES. Исследуемыми плазмидами трансфицировали клетки CHO 4BGD и после 1 раунда геномной амплификации определяли содержание гетеродимера и свободных цепей в культуральной среде. Концентрацию гетеродимерного ХГч измеряли ИФА, а α - и β -цепи в свободной и гетеродимерной формах – вестерн-блоттингом.

Результаты. Вестерн-блоттинг показал, что α -цепь обнаруживалась только в гетеродимерной форме, а β -цепь – в свободной и гетеродимерной. Удельная продуктивность по гетеродимеру ХГч для клеток с IRES риновируса и EMCV IRES была близкой: 1,7 пг/клетка и 1,2 пг/клетка соответственно. Отношение свободной β -цепи к гетеродимеру составило $4,78 \pm 1,50$ для плазмиды с IRES риновируса и $4,53 \pm 1,02$ для EMCV IRES, что соответствует уровням реинициации трансляции 17% и 19% без статистически значимых различий.

Выводы. Результаты показывают, что IRES риновируса человека обеспечивает уровень титра гетеродимера, сопоставимый с IRES EMCV, что позволяет использовать его в многоцистронных конструкциях для экспрессии фармацевтически значимых белков, избегая прямых повторов IRES EMCV и повышая генетическую стабильность конструкций.

BT17. Получение и характеристика новых пролин-богатых антимикробных пептидов из морской полихеты *Clymenella torquata*

А.Д. Уткина (utkina.ad@phystech.edu)^{1,2}, П.В. Пантелеев^{1,2}, Т.В. Овчинникова^{1,2}

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

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

Введение. Пролин-богатые антимикробные пептиды (ПБ-АМП) –это защитные молекулярные факторы системы врожденного иммунитета, обнаруженные у растений и животных, и характеризующиеся высоким содержанием остатков пролина в аминокислотной последовательности. Пептиды способны воздействовать на различные бактериальные мишени, в том числе рибосомы, представляя собой потенциальную альтернативу классическим антибиотикам. При анализе транскриптома морской полихеты *Clymenella torquata* была обнаружена последовательность BRICHOS-ассоциированного ПБ-АМП, включающая в себя 70 аминокислотных остатков и названная CtBRI-70. Целью данной работы является получение данного пептида и его укороченных аналогов, характеристика антимикробной активности, а также исследование способности пептида и его аналогов ингибировать бактериальную трансляцию.

Методы. Пептид CtBRI-70 и его аналоги были получены рекомбинантным путем в клетках *E. coli* Bl21(DE3) при помощи автоиндукции лактозой. Первичный скрининг антимикробной активности проводился с использованием широкой панели грамотрицательных и грамположительных штаммов бактерий. Исследование способности пептида и его аналогов ингибировать бактериальную трансляцию *in vivo* было проведено с использованием репортерных систем на основе бактерий *E. coli*.

Результаты. CtBRI70 и его аналоги обладают умеренной активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных штаммов бактерий, причем N-концевой аналог пептида проявил наибольшую активность. Также была выявлена высокая селективность действия полноразмерного варианта в отношении представителей рода *Mycobacterium*. Результаты исследований механизма действия указывают на способность полноразмерного варианта и N-концевых аналогов ингибировать биосинтез белка в бактериальной клетке посредством «сталлинга» рибосомы.

Выводы. Представитель нового класса ПБ-АМП, ассоциированных с BRICHOS-доменом – CtBRI-70, найденный в морской полихете *Clymenella torquata*, и его аналоги обладают умеренной антимикробной активностью и способны эффективно ингибировать бактериальную трансляцию *in vivo*.

BT18. Применение сканирующей зондовой микроскопии для изучения клеток крови

М.А. Шведов (shvedovmike@bk.ru)^{1,2}, В.А. Иноземцев¹, Е.А. Шерстюкова¹, В.А. Сергунова¹

¹*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского, Россия, Москва*

²*Российский университет дружбы народов, Россия, Москва*

Введение. Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) является универсальным инструментом для изучения широкого спектра материалов и особенно хорошо подходит для исследования живых клеток [1]. Целью данной работы стало показать возможности применения методов СЗМ, таких как атомно-силовая микроскопия (АСМ) и сканирующая ион-проводящая микроскопия (СИПМ), для исследования биомеханических и морфологических характеристик клеток крови, в частности нейтрофилов и эритроцитов.

Методы. Метод АСМ основан на регистрации силового взаимодействия между поверхностью исследуемого образца и зондом. СИПМ использует нанопипетку, заполненную электролитом, для изучения поверхности образца в жидкой среде. В работе были исследованы человеческие нейтрофилы.

Результаты. АСМ позволила визуализировать процесс НЕТоza в реальном времени, разделив его на три фазы: расширение хроматина, разрыв ядерной мембраны и высвобождение NET. Анализ показал, что модуль упругости контрольных клеток составляет 5.1 ± 2.2 кПа, а при активации клеток этот показатель увеличивается, что свидетельствует об изменении их жесткости. СИПМ позволил изучить морфологию живых нейтрофилов и их взаимодействие с эндотелиальными клетками под воздействием *Staphylococcus aureus*. Выявлено, что при таком взаимодействии жесткость нейтрофилов снижается.

Выводы. Сочетание этих методов позволяет комплексно исследовать морфологические, механические и биохимические аспекты клеточной динамики, включая процессы НЕТоza у нейтрофилов. АСМ обеспечивает детальную визуализацию наноструктуры и механических свойств, в то время как СИПМ позволяет анализировать биохимические процессы, такие как генерация АФК и распределение ионов, что углубляет понимание клеточных механизмов в норме и при патологических состояниях.

Литература

1. Shvedov, M., Sherstyukova, E., Kandrashina, S., Inozemtsev, V., Sergunova, V. (2024) "Atomic Force Microscopy and Scanning Ion-Conductance Microscopy for Investigation of Biomechanical Characteristics of Neutrophils" *Cells* 13, no. 21: 1757.

Содержание

Секция: Доклады	4
Д1. мРНК с короткими 3' нетранслируемыми областями представлены в транскриптом человека и имеют особенности трансляции	5
Д2. Сочетание in vitro и in vivo модельных систем для исследования гипертрофических изменений в миокарде у взрослых крыс.....	6
Д3. Хемогенетическая модель диабета первого типа на объекте Danio rerio.....	7
Д4. Исследование биологической активности и механизма действия β -спилечных танатин-подобных антимикробных пептидов у представителей подотряда Heteroptera ...	8
Секция: Биохимия.....	9
БХ1. Поиск молекулярных мишеней для азитромицина с целью коррекции нейровоспаления в период отмены алкоголизации в головном мозге крыс	10
БХ2. Взаимодействие фактора транскрипции E2F1 с ацетилтрансферазами в нейронах головного мозга после ишемии	11
БХ3. Модельная система для локальной индукции окислительного стресса в клетках Купфера печени мыши	12
БХ4. Структурно-функциональная характеристика уникального α -каротин-связывающего белка, определяющего желтую окраску саранчи	13
БХ5. Нарушения глюкокортикоидной системы потомства пренатально гипоксированных самок крыс сопровождается тревожно-депрессивным поведением	14
БХ6. Исследование влияния аминокислотных замен T31M, R45K и R192N на иммунохимические свойства рекомбинантной сердечной изоформы тропонина I человека	15
БХ7. Влияние тяжелой гипоксии на HIF1-зависимый метаболизм глюкозы в развивающемся и взрослом мозге крыс	16
БХ8. Разработка модели для исследования RAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 при фибротических изменениях в первичной культуре кардиофибробластов неонатальных крыс.....	17
БХ9. Изучение противоопухолевой активности новых производных гидроксамовых кислот в комбинации с доксорубицином на опухолевых клетках разного происхождения	18
БХ10. Изучение антирестрикционной системы DarA бактериофага P1	19
БХ11. Иммуно-RCA на микрочипе для высокочувствительной детекции антигликановых антител	20
БХ12. Уточнение строения активного центра гиспидин-3-гидроксилазы методом направленного мутагенеза.....	21
БХ13. Влияние полноразмерного Hsp70 и его фрагментов на выживание и гибель клеток на различных моделях повреждения нервной системы	22
БХ14. Изучение влияния полифункционального селенсодержащего антиоксиданта на показатели изолированного сердца при моделировании окислительного стресса	23
БХ15. Влияние мутаций в гене TPM1 на структуру и функции тропомиозина	24
БХ16. Разработка метода для оценки влияния мутаций в обратной транскриптазе ВИЧ-1 на ее структурное взаимодействие с ингибиторами обратной транскрипции.....	25
БХ17. Получение токсина OsK2 из яда черного скорпиона в рекомбинантной системе экспрессии.....	26
БХ18. Подбор условий выделения и очистки предполагаемой хитиназы Paralithodes	

camtschaticus	27
ВХ19. Выделение и очистка конститутивной 20S протеасомы. Изучение кинетики 20S протеасомы в присутствии природного активатора – спермина и его аналогов	28
ВХ20. Идентификация белкового окружения убиквитин-лигазы RNF168 с использованием TurboID	29
ВХ21. Каталитические особенности α -гидроксипирватдегидрогеназы кукурузы (<i>Zea mays</i> L.) и ее участие в адаптации растительной клетки к абиотическим стрессам	30
ВХ22. Белки, взаимодействующие с нуклеиновыми кислотами, как потенциальные участники патогенеза болезни Паркинсона	31
ВХ23. Влияние варианта с.886С>Т гена Th на активность тирозингидроксилазы и содержание биогенных аминов в мозге мышей	32
ВХ24. Роль остатка Т43 активного центра в функционировании трансаминазы D-аминокислот из <i>Desulfomonile tiedjei</i>	33
ВХ25. Исследование механизма зеленой окраски певчего кузнечика (<i>Tettigonia cantans</i>)	34
ВХ26. Изучение изменения экспрессии генов, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом при раке легкого	35
ВХ27. Цинк-зависимые сигнальные пути при глаукоме: роль индуцируемого фактора роста нервов VGF	36
ВХ28. Хомогенетическая генерация пероксида водорода в астроцитах для изучения патогенеза нейродегенеративных заболеваний	37
ВХ29. Фитохромная регуляция сукцинатсемальдегиддегидрогеназы и ГАМК-трансаминазы в зеленых листьях кукурузы (<i>Zea mays</i> L.)	38
ВХ30. Разработка цинк-независимой формы нейротропного фактора	39
ВХ31. Точность действия ДНК-полимеразы RB69 при синтезе с вытеснением цепи	40

Секция: Молекулярная и клеточная биология41

МБ1. Эволюционные аспекты защиты и активации бактериальной системы защиты PARIS на примере T5 подобных бактериофагов	42
МБ2. Дифференцировка эндотелиальных клеток из iPSC человека для васкуляризации нейтральных органоидов	43
МБ3. Эффективность комбинации онколитического вируса VVMCSF- Lact и ингибитора киназы Akt1 в отношении клеток глиомы человека in vitro	44
МБ4. Исследование комплекса на основе мРНК на модели риновирусной инфекции у мышей	45
МБ5. Получение и сравнение биохимических свойств РНКаз HII <i>Thermus thermophilus</i> , <i>Geobacillus stearothermophilus</i> и <i>E. coli</i>	46
МБ6. Клонирование, наработка и выделение белков для рекомбинантной полимеразной амплификации	47
МБ7. Сверхэкспрессия новой изоформы EML4-AS1 антисмысловой промоторной РНК гена EML4 в клетках линии немелкоклеточного рака легкого A549	48
МБ8. Изменение тиаминового метаболизма после бариатрической хирургии	49
МБ9. Исследование экспрессии генов редокс систем в нейросфероидсах с помощью РНК-секвенирования	50
МБ10. Участие компонентов внеклеточных везикул в нарушении адипогенной дифференцировки при старении	51

МБ11. Повышение экспрессии днРНК NEAT1 ассоциировано с устойчивостью к доцетакселу при раке предстательной железы на фоне ингибирования Wnt-сигналинга	52
МБ12. Биологическая активность аллогенных MSC и модифицированных NK клеток в отношении глиобластомы	53
МБ13. Интеркалированные мотивы в промоторах/UTR протоонкогенов и генов нейропластичности как pH-чувствительные регуляторы транскрипции	54
МБ14. Функциональный анализ транскрипционного фактора CsqR в <i>Escherichia coli</i>	55
МБ15. Поли(ADP-рибозил)ирование рибосомных белков человека ферментами PARP1 и PARP2 in vitro	56
МБ16. Реакция обратной транскрипции с переключением матрицы для выявления вариантов химерных транскриптов	57
МБ17. Эпигенетическая регуляция альтернативного сплайсинга генов синаптической пластичности в культурах нейронов	58
МБ18. Участие белка Nup93 в регуляции транскрипции экдизон-зависимых генов <i>Drosophila melanogaster</i>	59
МБ19. Моноциты и холангициты человека как модели для изучения регуляторной роли микроРНК внеклеточных везикул трематод <i>Opisthorchis felineus</i>	60
МБ20. Влияние нокаута гена Ube2a на подвижность и морфологию нейронов в процессе эмбрионального кортикогенеза мыши	61
МБ21. Влияние N-концевого якорного домена белка хвостовых шипов на свойства синтетических бактериофагов, поражающих <i>Klebsiella pneumoniae</i>	62
МБ22. Регуляция сумоилирования TRIM28 белком Kaiso: роль BTB домена и поиск новых модуляторов среди семейства BTB/POZ	63
МБ23. Влияние мутации G2019S в киназе LRRK2 на экспрессию компонентов внеклеточного матрикса и белков десмосомы в зрелых дофаминергических нейронах, дифференцированных из ИПСК	64
МБ24. Роль внеклеточных везикул в индукции опухолевого фенотипа в модели гетерогенной опухоли рака предстательной железы	65
МБ25. H2A.Z-содержащие нуклеосомы демонстрируют способность к образованию мультимолекулярного комплекса с p53 и PARP1	66
МБ26. Изменение молекулярных механизмов в нормальных и опухолевых клетках под действием ингибитора сплайсинга пладиенолида Б	67
МБ27. Особенности доставки целевых белков в опухолевые клетки глиобластомы мыши и человека с помощью штамма LIVP IL-15	68
МБ28. Поиск новых активаторов аутофагии среди бензоимидазопиримидинонов и исследование молекулярного механизма их действия	69
МБ29. Идентификация новых аутоантигенов при ревматоидном артрите	70
МБ30. Разработка молекул миРНК против консервативных участков генома РСВ	71
МБ31. Влияние однонитевых разрывов ДНК на связывание белка PARP1 с нуклеосомами	72
МБ32. Внесение генетических модификаций в культуру клеток свиней для создания животных для ксенотрансплантации органов	73
МБ33. Реинициация и протекающее сканирование в механизме устойчивой трансляции мРНК ATF5 к клеточным стрессам	74
МБ34. Анализ внутриклеточной локализации миозина 1C в интерфазных и митотических клетках рака предстательной железы человека	75
МБ35. Kaiso-зависимое сумоилирование: поиск и характеристика новых мишеней	76

МБ36. Изменения транскриптома опухоли GL261 при инфекции онколитическим вирусом VV-GMCSF-Lact и инъекциях GM-CSF человека и мыши	77
МБ37. Цитотоксическое действие нитрозильных комплексов железа на клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека.....	78
МБ38. Оценка влияния мутации с.7416_7418delGAA в гене филамина С (FLNC), ассоциированной с развитием рестриктивной кардиомиопатии, на протеостаз кардиомиоцитов	79
МБ39. Рецептор NKG2D играет ключевую роль в NK-клеточном ответе на фибробластоподобные производные ИПСК	80
МБ40. Роль линкерного гистона H1 в регуляции активности ферментов поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 и 2	81
МБ41. Абберрантная экспрессия группы генов системы апоптоза при раке почки.....	82
МБ42. Разработка репортерной системы для детекции G-квадруплексных структур в промоторной области гена TERT человека	83

Секция: Физиология и медицинская биохимия.....84

ФМ1. Участие ферментов синтеза и деградации анандамида, а также бета-аррестина-2 в регуляции секреции ацетилхолина в моторных синапсах мыши	85
ФМ2. Экспрессия микроглиального маркера Iba1 и состав микробиоты кишечника у крыс с контрастной возбудимостью нервной системы на поздних стадиях онтогенеза	86
ФМ3. Холестериновый конъюгат анти-Il6 малой интерферирующей РНК предотвращает развитие ЛПС-индуцированного острого повреждения лёгких на мышинной модели.....	87
ФМ4. Роль макрофагального ФНО- α в контроле проведения возбуждения АВ-узлом сердца при индукции системной воспалительной реакции у мышей.....	88
ФМ5. Исследование биораспределения in vivo нано-структур содержащих тетра-фенил профенерат цинка для диагностики онкологических заболеваний	89
ФМ6. Хроническая дисфункция тиамин-зависимых ферментов вызывает изменения метаболизма аминокислот мозга и рост тревожности животных.....	90
ФМ7. Оценка терапевтического эффекта комбинированной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток и нейральных прогениторных клеток на экспериментальной модели ишемического	91
инсульта	91
ФМ8. Изоформы белка Tbx3 играют различную роль в дифференцировке кардиомиоцитов крыс.....	92
ФМ9. Влияние сверхэкспрессии гена Deaf-1 в гиппокампе на поведение и серотониновую систему мозга мышей ASC (Antidepressants Sensitive Catalepsy) и C57BL6	93
ФМ10. Нарушения в иммунном ответе отличаются у мышей с нокаутом Cdk8/19 и у мышей Polg с митохондриальной дисфункцией	94
ФМ11. Изучение влияния хемогенетической активации астроцитов на синаптическую передачу в гиппокампе мышей in vitro.....	95
ФМ12. Нокаут Cdk8/19 приводит к нарушению метаболизма нейронов в коре головного мозга мышей C57bl/6	96
ФМ13. Иммунпротеасомы при травме спинного мозга у крыс линий SD и DA	97
ФМ14. Изучение путей созревания нейротрофина мозга в регенерирующих моторных синапсах.....	98
ФМ15. Склонность к никотиновой зависимости у взрослых крыс, переживших	

пренатальную гипоксию, связана с глюкокортикоид-зависимым нарушением экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в структурах лимбической системы мозга	99
ФМ16. Изучение влияния прогестерона при обструктивном холестазах у крыс на процессы, связанные с обменом холестерина	100
ФМ17. Влияние изомеризации аминокислотного остатка Asp7 в бета-амилоиде на его способность индуцировать патологию в инъекционной модели болезни Альцгеймера ..	101
ФМ18. Влияние тиреоидных гормонов на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз	102
ФМ19. Дозозависимые эффекты этанола в моторных синапсах мыши.....	103
ФМ20. Исследование влияния карбонил-цианид-4-(трифторметокси)-фенилгидразона (FCCP) на развитие атопического дерматита у мышей	104
ФМ21. Пермиссивное действие гормонов на стволовые клетки взрослого организма человека	105
ФМ22. Влияние сверхэкспрессии гена 5-HT7 рецептора в астроцитах фронтальной коры на поведение и серотониновую систему мозга мышей линии C57BL/6	106
ФМ23. Биохимия реакции окислительного стресса при ишемии миокарда	107
ФМ24. Модуляция молекулярных и поведенческих нарушений агонистами PPAR в модели височной эпилепсии	108
ФМ25. Интраназально вводимый инсулин как перспективный препарат при церебральной ишемии, сочетанной с сахарным диабетом 2 типа	109
ФМ26. Внутриклеточный механизм созревания нейротрофина мозга доминирует в зрелых нервно-мышечных синапсах мыши и обеспечивает сочетанное ретроградное действие BDNF и его продомена.....	110
ФМ27. Влияние введения бактериального липополисахарида на поведение и метаболизм серотонина в мозге мышей с нокаутом гена, кодирующего фосфатазу STEP.....	111

Секция: Биотехнология.....112

БТ1. Разработка способа получения мелкодисперсного скаффолда-биомиметика внеклеточного матрикса из децеллюляризованной селезенки свиньи.....	113
БТ2. Разработка нанокапиллярного сенсора для определения глюкозы.....	114
БТ3. Влияние нокаута гена StPAIN-1 технологией CRISPR/Cas9 на содержание углеводов в клубнях картофеля <i>S. tuberosum</i>	115
БТ4. Оптимизация диагностической платформы на основе нуклеазы CcCas9 для выявления мутации H275Y вируса гриппа	116
БТ5. Пористый каркас для тканевой инженерии хрящевой ткани.....	117
БТ6. Создание тканеинженерного конструкта методом электроформования с биокомпонентами для регенерации скелетных мышц.....	118
БТ7. Биосенсор фенолов на основе композита из пиррола, термообработанного полиакрилонитрила и рекомбинантной тирозиназы	119
БТ8. Создание мутантного штамма PY79 клеток <i>Bacillus subtilis</i> с повышенной продукцией липопептидного ПАВ сурфактина.....	120
БТ9. Получение рекомбинантных алергокомпонентов Ole e 2, Ole e 3.....	121
БТ10. Методический подход для выявления пьезоэффекта на поверхности полимерного материала в условиях биологического эксперимента по адгезии бактерий с использованием <i>Lactobacillus fermentum</i>	122
БТ11. Расщепляющие глютен протеазы микромицетов рода <i>Aspergillus</i>	123

BT12. Исследование циркулирующей опухолевой ДНК у больных тройным негативным раком молочной железы в процессе первичного лечения (серия наблюдений)	124
BT13. Разработка системы для направленной интеграции генетических конструкций в заданное место генома с использованием рекомбиназы Vxb1	125
BT14. Создание высокоэффективного алгоритма интерпретации нелинейных сигналов автофлуоресценции ишемизированной сердечной ткани	126
BT15. Поиск новых танатин-подобных антимикробных пептидов	127
BT16. Сайт внутреннего связывания рибосом риновируса человека эквивалентен эталонному сайту внутреннего связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV IRES) при экспрессии генов цепей хорионического гонадотропина человека	128
BT17. Получение и характеристика новых пролин-богатых антимикробных пептидов из морской полихеты <i>Clymenella torquata</i>	129
BT18. Применение сканирующей зондовой микроскопии для изучения клеток крови ...	130