



Санкт-Петербургский
государственный
университет



ACCELLENA

RESEARCH AND DEVELOPMENT

4-я ежегодная конференция
Института Трансляционной Биомедицины СПбГУ
(ИТБМ СПбГУ)



**«Актуальные проблемы трансляционной
биомедицины - 2018»**

Сборник тезисов

20-22 июля
Санкт-Петербург
2018





Организационный комитет конференции:

Председатель: Климова Елена Сергеевна, генеральный директор ООО «Экселлена Рисеч энд Девелопмент».

Сопредседатель: Рубель Александр Анатольевич, к.б.н., н.с., заместитель руководителя Научной лаборатории биологии амилоидов СПбГУ.

Секретарь: Янченко Денис Геннадьевич, к.и.н., доцент Института истории СПбГУ.

Члены Оргкомитета:

Ефимова Евгения Викторовна, к.б.н., н.с., Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии.

Католикова Наталья Викторовна, инженер-исследователь Института трансляционной биомедицины СПбГУ.

Онохин Кирилл Вячеславович, н.с. ПАО «Фармсинтез», ассистент Биологического факультета СПбГУ.

Рубель Мария Сергеевна, н.с., Научная лаборатория биологии амилоидов СПбГУ.

Степченкова Елена Игоревна, к.б.н., зав. лабораторией Санкт-Петербургского филиала Института общей генетики им. В.И. Вавилова РАН.

Сопова Юлия Викторовна, к.б.н., научный сотрудник Санкт-Петербургского филиала Института общей генетики им. В.И. Вавилова РАН.

Янченко Маргарита Важиковна, независимый исследователь.

Лаишул Вероника Владимировна, лаборант исследователь, Научной лаборатории биологии амилоидов СПбГУ

Майтова Анастасия Владимировна, инженер-исследователь, Научной лаборатории биологии амилоидов СПбГУ

Программный комитет:

Председатель: Гайнетдинов Рауль Радикович - к.м.н., директор Института трансляционной биомедицины СПбГУ, профессор Сколковского института науки и технологий, консультант Итальянского института технологий.

Сопредседатель: Чернов Юрий Олегович - к.б.н., профессор Технического университета Джорджии (Атланта, США), руководитель Научной лаборатории биологии амилоидов СПбГУ, заведующий лабораторией геномных и протеомных исследований СПбГУ.

Члены программного комитета:

Рубель Александр Анатольевич, к.б.н., н.с., заместитель руководителя Научной лаборатории биологии амилоидов СПбГУ.

Онохин Кирилл Вячеславович, н.с. ПАО «Фармсинтез», ассистент Биологического факультета СПбГУ.

Янченко Денис Геннадьевич, к.и.н., доцент Института истории СПбГУ.



Когда хвосты влияют геномом: новые механизмы нестабильности ассоциированные с повторяющейся ДНК

Аксенова А.Ю.¹, Радченко Э.А.², Павлов Ю.И.³, Миркин С.М.²

1 – Научная лаборатория Биологии Амилоидов СПбГУ

2 – Department of Biology, Tufts University, Medford, USA

3 – Eppley Institute for research in cancer and allied diseases, Omaha, USA

Контактный e-mail: aksena@gmail.com

Геном человека содержит множество нестабильных последовательностей, являющихся горячими точками мутагенеза и способных динамически изменяться. Одним из примеров таких последовательностей являются, принадлежащие к группе микросателлитов, тринуклеотидные повторы с экспансией которых ассоциировано около 30 генетических заболеваний человека. К микросателлитам относятся также и теломерные повторы, которые являются основным структурным компонентом теломер. Теломерные повторы выполняют критически-важную функцию в поддержании стабильности генома, однако являются одними из самых нестабильных элементов генома. Мы обнаружили, что также, как и дрожжевые теломерные повторы, повторы (TTAGGG)_n/(CCCTAA)_n, характерные для человека, нестабильны в геноме дрожжей. Однако генетический контроль нестабильности этих повторов отличается от того, что мы показали для дрожжевых теломерных повторов. Новые подходы позволили нам идентифицировать факторы, играющие принципиальную роль в механизмах экспансии человеческих теломерных повторов. Так, наши данные указывают на значительную роль, выполняемую факторами, регулирующими структуру и свойства хроматина, в контроле нестабильности этих последовательностей. А именно, частота экспансий теломерных повторов зависела от работы комплексов, осуществляющих модификацию хвостов гистонов. Вместе с тем мы показали, что способность человеческих теломерных повторов к экспансиям в высокой степени определяется также проскальзыванием вилки репликации во время синтеза ДНК на повторе. Полученные данные имеют принципиальное значение для понимания механизмов, лежащих в основе стабильности генома, механизмов экспансии повторов, а также механизмов альтернативного удлинения теломер. Данные обсуждаются в контексте наших недавних публикаций, касающихся механизмов экспансий тринуклеотидных повторов (GAA)_n, а также механизмов экспансий и хромосомных перестроек, индуцированных дрожжевым теломерными трактами. Работа поддержана грантами РФФИ №15-04-08658 и РФФИ №18-04-00799.

Литература:

1. Anthony Moore, Margaret Dominska, Patricia Greenwell, Anna Y. Aksenova, Sergei Mirkin and Thomas Petes Genetic control of genomic alterations induced in yeast by interstitial telomeric sequences 2018 Genetics Jun;209(2):425-438. doi: 10.1534/genetics.118.300950.
2. Ryan J. McGinty, Franco Puleo, Anna Y. Aksenova et al., A Defective mRNA Cleavage and Polyadenylation Complex Facilitates Expansions of Transcribed (GAA)_n Repeats Associated with Friedreich's Ataxia 2017 Cell Reports 20, 2490–2500 doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.051
3. Anna Y. Aksenova, Gil Han, Alexander A. Shishkin, Kirill V. Volkov and Sergei M. Mirkin Expansion of interstitial telomeric repeats in yeast. 2015 Cell Reports 13(8) 1545–1551 doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.023



-
4. Anna Y. Aksenova, Patricia W. Greenwell, Margaret Dominska, Alexander A. Shishkin, Jane C. Kim, Thomas D. Petes, and Sergei M. Mirkin; Genome rearrangements caused by interstitial telomeric sequences in yeast. 2013 PNAS 110 (49) 19866-19871. doi: 10.1073/pnas.1319313110



Доклинические исследования: о чем нужно знать разработчикам лекарственных средств

Александров Г.В.

Лаборатория ДКИ ООО «Фармакоген» Ленинградская область, Всеволожский район, село Павлово, ул. Быкова д.84Б. E-Mail: fmgen@fmgen.ru Тел. 8-(812)-929-20-49

Доклинические исследования (ДКИ) являются неотъемлемым этапом разработки любого оригинального лекарственного препарата (ЛП), который планируется к клиническому изучению и регистрации на территории РФ. В соответствии с Федеральным законом от 12.04.2010 N 61-ФЗ "Об обращении лекарственных средств" для получения разрешения на проведение клинических испытаний, а также для регистрации ЛП необходимо провести его фармакодинамические, фармакокинетические и токсикологические исследования. На основании полученных данных оценивают потенциальную опасность ЛП для человека, выявляют органы и системы подверженные действию ЛП, определяют наличие у ЛП алергизирующего, мутагенного или тератогенного потенциала. Расчет доз и схем введения ЛП для клинических исследований и терапевтического применения также проводится с учетом данных полученных в ДКИ.

Поскольку результаты ДКИ могут быть жизненно важными, в первую очередь для добровольцев участвующих в клинических исследованиях, общие правила их организации и проведения регламентированы Приказом МЗ РФ от 01.04.2016 N 199н "Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики". Сходные требования к организации и проведению ДКИ содержатся в следующих документах, имеющих статус действующих на территории РФ: ГОСТ 33044-2014, OECD Principles on Good Laboratory Practice, Правила надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза (ЕАЭС) в сфере обращения лекарственных средств.

Перечень и особенности конкретных экспериментов по изучению безопасности и эффективности индивидуальны для каждого ЛП, они должны быть научно обоснованы, однако законодательно не регламентируются. Тем не менее, существует ряд руководств, рекомендации которых следует учитывать. Наиболее актуальными являются: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Части первая и вторая под ред. А.Н. Миронова; Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 1-4 под ред. А.Н. Миронова; Документы международных организаций OECD и ICH, а также сформированные на их основании ГОСТы. В настоящий момент идет активная разработка новых руководств по проведению ДКИ структурами ЕАЭС, которые в значительной мере гармонизируют отечественные и международные рекомендации к проведению ДКИ.



Поиск и сборка плазмид из геномных и метагеномных данных

Антипов Д.Ю.¹, Райко М.П.¹, Лapidус А.Л.¹, Певзнер П.А.^{1,2}

1 – Центр алгоритмической биотехнологии, Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

2 – Department of Computer Science and Engineering, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA

При всей важности плазмид для выживания бактерий и их адаптации к окружающей среде, их поиск и сборка из геномных, и, в особенности, из метагеномных данных остается нетривиальной задачей. Разработанный недавно специализированный алгоритм для сборки плазмид `plasmidSPAdes` решил часть проблем в случае геномных данных, но принципиально не подходит для метагеномных данных - потенциального источника огромного числа еще неизвестных плазмид. Мы представляем алгоритм `metaplasmidSPAdes` позволяющий собирать плазмиды из метагеномных данных со значительно меньшей долей ложноположительных ответов в сравнении с существующими решениями. Мы собрали плазмиды из разнообразных данных и продемонстрировали что большое количество плазмид оставалось не обнаруженными в тысячах завершенных геномных и метагеномных исследований. Наш анализ показал большое разнообразие плазмид и неожиданно большую долю плазмид (включая плазмиды несущие гены устойчивости к антибиотикам) без существенного сходства с известными последовательностями. Данная работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-50-00069).



Конструирование высокочувствительных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для выявления первичных повреждений генетического материала

Афанасова Д.В.¹, Жук А.С.^{1,2}, Степченкова Е.И.^{1,2}

1 – Санкт-Петербургский государственный университет

2 – Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, РАН

Стабильность генетического материала является обязательным условием надежной передачи наследственных признаков в последовательных поколениях живых организмов. Факторы, взаимодействующие с процессами наследственности, могут приводить к возникновению мутаций и, как следствие, вызвать различные генетические и онкологические заболевания. В связи с этим актуально своевременное выявление генетически активных факторов различной природы, а также определение уровня активности мутагенных факторов. Эффективная тест-система должна соответствовать следующим требованиям: высокая пропускная способность, высокая чувствительность к мутагенам и возможность определения различных типов повреждений генетического материала. Этим требованиям отвечает разработанная ранее в лаборатории физиологической генетики Санкт-Петербургского государственного университета уникальная тест-система для дрожжей *S. cerevisiae* – альфа-тест. Альфа-тест основан на учете событий, приводящих к «незаконной» гибридизации гетероталлических штаммов дрожжей одинакового α типа спаривания. Ранее в ходе исследований с использованием альфа-теста были определены направления для дальнейшего повышения эффективности теста. Целью данного проекта стало совершенствование тест-системы, посредством модификации штаммов дрожжей, направленной на повышение чувствительности тестерных штаммов и упрощение процедуры тестирования. С использованием методов частной генетики дрожжей и методов молекулярной биологии в базовые штаммы, используемые в альфа-тесте, были внесены генетические модификации, которые позволили повысить эффективность выявления редких нарушений генетического материала и снизить трудозатраты при тестировании потенциальных мутагенов. Полученные нами штаммы были проверены на чувствительность к эталонным мутагенам. Мы показали, что полученные нами штаммы на порядок более чувствительны к различным мутагенам чем базовые штаммы для альфа-теста. Результаты, полученные нами, имеют фундаментальное значение для изучения механизмов мутационного процесса, а также для практических целей генетической токсикологии.

Работа поддержана РФФИ 18-34-00130 мол_а и РНФ 14-50-00069. Авторы благодарят Ресурсные центры СПбГУ «Биобанк» и «РМиКТ».



Аномальный гамма-ритм у крыс, нокаутных по гену дофаминового транспортера

Белов Д.Р., Лакстыгал А.М., Фесенко З.С., Гайнетдинов Р.Р.

Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет

Исходя из известной роли дофамина при шизофрении, в данной работе предпринята попытка обнаружить отличия в электрокортикограмме (ЭКОГ) обычных крыс Вистар от крыс, нокаутных по гену дофаминового транспортера, с нарушенным обратным захватом дофамина из синаптической щели с вытекающей гиперстимуляцией рецепторов. Эти крысы могли бы быть предложены как животная модель шизофрении. У пациентов с шизофренией имеются изменения мощности гамма-ритма (30-100 Гц) и пространственной синхронизации в гамма-диапазоне ЭЭГ. Это указывает, что ключевую роль в когнитивных дефицитах при шизофрении играют нарушения в правильной синхронной ритмике нейронов, которая весьма важна для памяти, восприятия и сознания. Поэтому особое внимание нами было уделено критичному для шизофрении гамма-ритму 30-100 Гц.

Запись ЭКОГ сравниваемых животных велась в ходе острых опытов под наркозом при помощи плёнчатого мультиэлектродного массива Neuronexus E32-600-10-100 с 32-мя сайтами регистрации по 100 мкм (импеданс сайта 500 КОм) с межсайтовыми интервалами 600 мкм. Эти характеристики дают устойчивую регистрацию гамма-ритма на малом масштабе с достаточной локальностью, причём даже под наркозом. Записи низкоомных электродов содержат мало гамма-ритма, а под наркозом - в основном медленную ритмику. В отличие от этого, в нашем случае размер сайта 100 мкм обеспечивает суммацию нескольких сотен нейронов, т.е. считанных единиц гамма-осцилляторов, что даёт и под наркозом богатую и чёткую картину гамма-колебаний.

Были исследованы 7 взрослых самцов Вистар и 6 трансгенных особей – 3 гетерозиготы и 3 полных нокаута. У всех крыс ритмическая активность под наркозом сводилась к двум видам – гамма-ритм 30 Гц и сериям волн, идентифицированных как веретёна (разновидность сигма-ритма). Веретёна при таком методе тоже содержали высокую примесь гамма-активности, наложенной на сигма-волны. У трансгенных крыс гамма-мощность оказалась выше по сравнению с нормальными крысами Вистар. Пространственная гамма-синхронизация, наоборот, была минимальной у полных нокаутов, образовавших однородную компактную группу с резкими отличиями от «нормальных Вистар». Гетерозиготы дали промежуточные значения. Сигма-веретена сопровождаются снижением пространственной синхронизации наложенных гамма-колебаний по сравнению с межверетёнными интервалами. Кроме того, по предварительным данным, веретённая активность (число веретён в минуту) у трансгенных крыс была в целом сниженной по сравнению с нормой. То же описано и у пациентов с шизофренией. Согласно дофаминовой теории, при шизофрении имеет место гиперстимуляция стриатума и кортикальная гиподофаминергия (из-за дисрегуляции со стороны других структур), т.е. функциональная недостаточность коры, вызывающая когнитивные дефициты и негативные симптомы. Доказано также, что при веретёнах кора блокируется от стимулов, а активность её нейронов угнетается. Поэтому обнаруженный дефицит веретён у нокаутных крыс согласуется с описанной функциональной недостаточностью коры.



Анализ структурных вариаций локуса тяжелых цепей иммуноглобулинов человека

Бзикадзе А.^{1,2}, Сафонова Я.³, Певзнер П.^{1,4}

1 — Центр алгоритмической биотехнологии, Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

2 — Bioinformatics and System Biology Graduate Program, University of California, San Diego, La Jolla, USA

3 — Center for Information Theory and Applications, University of California, San Diego, La Jolla, USA

4 — Department of Computer Science and Engineering, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA

Формирование антител — чрезвычайно сложный процесс, включающий в себя несколько стохастических процессов. Число патогенных угроз, с которыми человек сталкивается в течении своей жизни невероятно велико и таково разнообразие антител в каждом индивидууме. Такое разнообразие достигается с помощью, в частности, VDJ рекомбинации, негеномных вставок и удалений, спаривания тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов и соматического гипермутагенеза. Локус тяжелых цепей (IGH) иммуноглобулинов содержит три семейства гермлайновых иммуно-сегментов под названием V, D и J. VDJ рекомбинация синтезирует новое антитело посредством случайного выбора сегмента каждого типа с последующим объединением этих сегментов. В дальнейшем, объединенная последовательность сегментов подвергается соматическому гипермутагенезу. Так как каждое антитело уникально и иммунная система постоянно развивается, количество информации в ней на несколько порядков выше, чем во всем геноме человека.

Популяционный анализ разнообразия иммунного локуса в людях — критически важен для понимания процесса формирования антител. IGH локус представляет из себя один из самых сложных, повторных и разнообразных регионов человеческого генома. Хотя референсная последовательность локуса была собрана 20 лет назад, локус индивидуальных людей значительно отличается от референсного локуса. Несмотря на то, что последние исследования улучшили сборку локуса, его популяционный анализ и анализ его структурных вариаций между различными людьми остается открытой проблемой. Мы представим последние результаты анализа разнообразия локуса и продемонстрируем, что структурные вариации представляют из себя одну из основных движущих сил в достижении этого разнообразия.

Данная работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-50-00069).



Результаты создания генно-модифицированной клеточно-инженерной конструкции для замещения поверхностных дефектов гиалинового хряща

Божокин М.С.¹, Божкова С.А.¹, Рубель А.А.^{2,3}, Качкин Д.В.², Нащекина Ю.А.⁴.

1 – ФГБУ РНИИТО им. Р.Р.Вредена, Санкт-Петербург, Россия

2 – Научная лаборатория биологии амилоидов СПбГУ, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

3 – Кафедра генетики и биотехнологии СПбГУ, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

4 – ФГБУ Институт цитологии Российской академии наук Санкт-Петербург, Россия

Травматические повреждения гиалинового слоя суставной поверхности на сегодняшний день являются чрезвычайно актуальной проблемой во всем мире. Несмотря на различные способы восстановления хрящевой поверхности, эффективного решения данной проблемы до сих пор не найдено, в том числе и из-за отсутствия способности гиалинового хряща к регенерации. Одним из перспективных направлений является трансплантация генно-модифицированных клеточно-инженерных конструкций (КИК) для замещения дефекта гиалинового слоя с последующей интеграцией в неповреждённый хрящ.

Оценить в эксперименте возможность создания генно-модифицированной клеточно-инженерной конструкции на основе полимолочной кислоты и культуры трансфецированных ММСК. Клетки костного мозга выделяли из бедренных костей половозрелых крыс, подтверждение фенотипа ММСК проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Aria III с использованием моноклональных антител CD45 и CD90. Биodeградируемые матрицы для культивирования готовили методом вспенивания из полилактида. Плазмиды для трансфецирования содержали гены *sox9* и *tgfb3*. Исходные нуклеотидные последовательности были взяты из плазмид pVABEPuro-*rnSOX9* и pLVE-hTGFB3-IRES-Red. Совмещение культуры клеток проводили в специально разработанном устройстве динамическим способом под действием избыточного давления N₂.

При анализе клеточной культуры на проточном цитофлуориметре установлено содержание не менее 96, кгдш6% CD45- и CD90+ клеток. С помощью секвенирования была подтверждена необходимая последовательность созданных плазмид. Под действием динамического заселения культуры клеток и биodeградируемого носителя было получено заданное равномерное распределения ММСК внутри пористой полилактидной матрицы. Трансфецирование ММСК созданной генетической конструкцией под воздействием химических методов показало очень низкую эффективность, в отличие от трансфецирования линии НЕК293 созданными плазмидами.

Разработанная методика получения и динамического совмещения клеток и биodeградируемого носителя позволила получать КИК, однако, требуются дополнительные исследования, направленные на увеличение эффективности трансфецирования клеточной культуры ММСК созданными плазмидами, кодирующие гены *sox9* и *tgfb3*.



Влияние высокоселективного агониста рецепторов следовых аминов 1-го подтипа (TAAR1) RO5263397 на депривационный эффект у крыс

Бортников Н.С.¹, Дорофейкова М.В.¹, Гайнетдинов Р.А.², Суханов И.М.¹

1 – Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П.Павлова, Институт фармакологии им. А.В. Вальдмана, отдел психофармакологии, лаборатория фармакологии поведения

2 – Санкт-Петербургский государственный университет, Институт трансляционной биомедицины

Введение. «Депривационный эффект» (ДЭ) – феномен, заключающийся в увеличении потребления психоактивных веществ или сахараина вслед за периодом депривации. ДЭ используют для моделирования болезней лекарственной зависимости в доклинических исследованиях. Из предшествующих работ, известно, что рецепторы следовых аминов 1-го подтипа (TAAR1) экспрессируются в дофаминергических зонах ЦНС и участвуют в регуляции активности дофаминергической системы, играющей ключевую роль в патогенезе болезней зависимости.

Цель. Оценить действие высокоселективного агониста TAAR1 RO5263397 на депривационный эффект у крыс.

Материалы и методы. Исследование проводили на 10 самцах крыс стока Wistar возрастом 3-4 месяца. Животных содержали поодиночке в стандартных клетках ТЗ. Эксперимент проводили в домашних клетках. У животных был свободный доступ к двум бутылкам, с водой и с 0,1% раствором сахараина. После того как было установлено предпочтение раствора сахараина, бутылки с ним удалялись на 7 дней. После возвращения этих бутылок наблюдалось увеличение потребления сахараина (ДЭ), семидневные периоды депривации повторялись каждые 4 недели. RO5263397 или растворитель вводили внутрибрюшинно за 15 минут до возвращения бутылок с раствором сахараина. Порядок тестирования различных доз препарата (0, 1,0, 3,0 и 6,0 мг/кг) определяли по схеме “латинский квадрат”.

Результаты: RO5263397 в дозе 6 мг/кг достоверно снижал потребление 0,1% раствора сахараина в первый и третий час первых суток после возвращения доступа крыс к сахараину.

Выводы: Результаты эксперимента могут свидетельствовать о том, что TAAR1 перспективная мишень для разработки средств терапии лекарственных зависимостей.



Гибридная сборка транскриптомов и улучшение генома артишока

Бушманова Е.А.

Центр алгоритмической биотехнологии, Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Возможность получения длинных транскриптомных прочтений, таких как прочтения Oxford Nanopore, может значительно улучшить сборку транскриптомов и, следовательно, дополнить существующую базу генов плохо аннотированных геномов. Задача de novo сборки транскриптома из коротких прочтений усложняется неравномерным покрытием, вызванным высокой вариацией в уровнях экспрессии различных генов, альтернативным сплайсингом и наличием в геноме паралогичных генов. Длинные прочтения могут быть полезны в преодолении этих проблем и, тем самым, позволяют генерировать более полные изоформы. В этой работе описаны модификации алгоритмов rnaSPAdes, позволяющие гибридную сборку, а также приведена оценка качества полученных сборок с и без длинных прочтений. Результаты, достигнутые с помощью длинных прочтений приведены на примере улучшения аннотации генома артишока.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №14-50-00069.



Разработка метода диагностики вируса гепатита С с использованием технологии биочипов

Волокитина М.В.^{1,2}, Поляков Д.С.^{1,3}, Коржикова-Влах Е.Г.^{1,2}, Тенникова Т.Б.²

1 – *Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

2 – *Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

3 – *Институт экспериментальной медицины Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

Разработка биологических микрочипов является одним из наиболее быстро развивающихся экспериментальных направлений современной науки. Биочипы представляют собой устройства, принцип действия которых основан на биологическом распознавании, т.е. на способности аналита образовывать аффинный комплекс с иммобилизованным на поверхности материала лигандом. Эффективность биочипов обусловлена возможностью параллельного проведения огромного количества специфических реакций и взаимодействий различных биомолекул, таких как ДНК, белки, полисахариды и др. В настоящее время биологические микрочипы широко применяются для быстрого и чувствительного определения различных диагностических маркеров. Целью данной работы была разработка биочипов для диагностики вируса гепатита С.

В процессе исследования методом свободно-радикальной фотоиницируемой сополимеризации в массе была синтезирована серия макропористых монолитных материалов для изготовления 3-D биочипов на основе сополимеров глицидилметакрилата с диэтиленгликольдиметакрилатом (ГМА-ДЭГДМА). Биологические микрочипы были получены методом ковалентной модификации поверхности макропористых монолитных матриц специфическими лигандами (фрагмент вирусного рецептора CD-81 или антитела к поверхностному белку E2 гепатита С).

При использовании разработанных биочипов были изучены различные варианты проведения биоанализа, заключающиеся как в простых процедурах взаимодействия иммобилизованного CD-81 (1) или иммобилизованных антител (2) с поверхностным рекомбинантным белком E2, так и в реализации сэндвич-метода (3), заключающегося в проведении последовательного парного взаимодействия – сначала между иммобилизованным фрагментом рецептора CD-81 с E2, затем с антителами, мечеными флуоресцентной меткой Су3. Посредством детального изучения закономерностей биоанализа и влияния различных параметров проведения процедуры специфического взаимодействия на эффективность биоанализа были определены оптимальные условия эксплуатации разработанных биочипов и продемонстрирована возможность определения количественных параметров аффинного связывания, а именно, кажущейся константы диссоциации специфических комплексов антитела–E2 и CD-81–E2.

Разработанные методики были использованы для апробации детектирования физико-химических моделей вируса гепатита С, представляющих собой полимерные частицы, содержащие на поверхности специфический лиганд, а именно, рекомбинантный белок E2. Показана высокая эффективность анализа моделей вируса гепатита С в плазме крови. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-50-00069, направление 05-109).



Поиск и валидация вариантных пептидов в раковых клеточных линиях

Вяткина К.В.¹⁻⁴, Лобас А.А.⁵, Левицкий Л.И.⁵, Иванов М.В.⁵, Соловьева Е.М.^{5,6},

Мошковский С.А.⁷, Горшков М.В.^{5,6}

1 – Санкт-Петербургский государственный университет, Институт трансляционной биомедицины

2 – Санкт-Петербургский Академический университет РАН

3 – Университет ИТМО

4 – Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ»

5 – Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН

6 – Московский физико-технический институт (государственный университет)

7 – Институт биомедицинской химии

В организме каждого человека присутствует множество отклонений от стандартного генетического кода. К наиболее распространенному типу генетических вариаций относятся однонуклеотидные полиморфизмы, приводящие к точечным аминокислотным заменам в природных белках, способным существенно изменять их свойства и порой влекущим за собой тяжелые заболевания, включая рак. Важную задачу представляет собой детектирование таких мутантных белков, однако ее решение затрудняет их отсутствие в консенсусных базах данных белков, полученных по результатам геномного секвенирования.

В рамках данного исследования был разработан метод детектирования и валидации вариантных пептидов в раковых клеточных линиях с использованием данных масс-спектрометрии высокого разрешения. В соответствии с предложенным подходом, вначале исходные MS/MS-спектры обрабатываются при помощи алгоритма Twister [1,2] для *de novo* секвенирования пептидов. С использованием полученных таким образом фрагментов пептидов, содержащихся в анализируемых образцах, выполняется сопоставление MS/MS-спектров с базой данных пептидных последовательностей дикого типа; его результатом является обширный список вариантных последовательностей-кандидатов. В завершение применяется фильтрация, позволяющая исключить из рассмотрения последовательности, полученные вследствие ошибочной интерпретации модифицированных пептидов из базы, а также ненадежные идентификации.

Эффективность изложенного выше метода была проиллюстрирована на примере восьми клеточных линий, проанализированных на масс-спектрометре Thermo Orbitrap Q Exactive Plus с разрешением 140000 и 17500 для MS- и MS/MS-спектров, соответственно. База данных пептидных последовательностей дикого типа была сгенерирована на основе базы данных SwissProt (версия 02/2015) протеома человека.

Работа была поддержана РФФИ (грант 16-54-21006).

Список литературы

K.Vyatkina, S. Wu, L.J.M. Dekker et al. *De novo sequencing of peptides from top-down tandem mass spectra*. J. Prot. Res., 14(11): 4450-4462, 2015.

K.Vyatkina, L.J.M. Dekker, S. Wu et al. *De novo sequencing of peptides from high-resolution bottom-up tandem mass spectra using top-down intended methods*. Proteomics, 17(23-24), 2017. doi: 10.1002/pmic.201600321.



Разработка новых подходов в диагностике преэклампсии

Герасимова Е.М.^{1,2}, Куличихин К.Ю.³, Рубель А.А.^{1,2}, Вашукова Е.С.⁶, Пакин В.С.⁶, Глотов А.С.^{5,6}, Чернов Ю.О.^{1,3,4}, Федотов С.А.¹

1 – Научная лаборатория биологии амилоидов СПбГУ, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

2 – Кафедра генетики и биотехнологии СПбГУ, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

3 – Лаборатория геномных и протеомных исследований, Институт трансляционной биомедицины СПбГУ, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

4 – Технологический институт Джорджии, Атланта, США

5 – ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

6 – ФГНБУ «НИИАГиР им.Д.О.Отта», Санкт-Петербург, Россия

Преэклампсия (ПЭ) – это патологическое состояние, возникающее после 20-й недели беременности и проявляющееся триадой симптомов: артериальной гипертензией, протеинурией и отеками. ПЭ относится к числу самых распространенных осложнений беременности. Особое значение ПЭ обусловлено высоким уровнем материнской и детской заболеваемости и смертности. Несмотря на длительную историю изучения, этиология и патогенез ПЭ остаются по-прежнему малопонятными, отсутствуют достоверные лабораторные методы диагностики этого осложнения беременности. Поэтому существует необходимость проведения исследований, направленных на создание новых диагностических тестов ПЭ.

Ранее Vuhimschi с соавт. (2008) выявили в образцах мочи беременных с ПЭ белки, склонные к агрегации (SERPINA1, бета-амилоид др.). Авторами была показана возможность использования теста на окрашивание белков мочи беременных амилоид-специфическим красителем Конго красным (CRD, Congo Red Dot) для постановки диагноза ПЭ. При этом диагностический и прогностический потенциал CRD-теста оказался выше, чем для экспресс-оценок при помощи диагностических полосок.

Нами была выполнена собственная оценка эффективности применения красителя Конго красного для подтверждения и уточнения диагноза ПЭ. С помощью CRD-теста были проанализированы образцы мочи беременных с ПЭ (n=15) и группы контроля (n=15). Образцы выравнивали по концентрации белка: концентрация белка в каждой пробе оценивалась методом Брэдфорда, концентрирование проводилось при помощи центрифужных пробирок для концентрирования белков с молекулярной массой выше 5 кДа (VIVASPIN, Sartorius). Далее образцы инкубировали с красителем и наносили на нитроцеллюлозную мембрану, после чего отмывали в течение ночи. Для каждого образца рассчитывали коэффициент удержания Конго (CRR). Было установлено, что данный показатель у женщин с ПЭ статистически значимо выше, по сравнению с контрольной группой. На основании результатов в данных и последующих экспериментах планируется определить диапазон значений показателя CRR, указывающий на развитие ПЭ. Дополнительно была проведена оптимизация метода CRD-теста Vuhimschi и соавт. (2008). Показана возможность непосредственного нанесения образцов на мембрану с Конго красным без предварительного инкубирования, а также использование более безопасных реагентов.

Помимо CRD-теста для детекции бета-амилоидных белков в образцах мочи может быть использован метод циклической амплификации (Protein Misfolding Cycling Amplification, PMCA). Показано, что реакция PMCA позволяет увеличить изначально малые количества агрегатов бета-амилоида в образцах мочи до уровня, детектируемого



флуоресцентным красителем Тиофлавином Т при связывании с агрегатами (Salvadores et al., 2014). Нами была введена в работу система детекции агрегатов бета-амилоида методом РМСА в растворе химически синтезированных мономеров бета-амилоида. Совместное применение CRD-теста и РМСА в дальнейшем будет способствовать созданию золотого стандарта диагностики ПЭ и его внедрению в практику российской медицины.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № «14-50-00069» на базе ресурсных центров «Хромас», «Биобанк», «РМиКТ».



Идентификация новых лигандов рецепторов следовых аминов для фармакологических и молекулярно-биологических исследований

Герасимов А.С.¹, Коренькова О.М.¹, Espinoza S.³, Гайнетдинов Р.Р.^{1,2}

1 – Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии института трансляционной биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

2 – Сколковский институт науки и технологий, Московская область, Россия;

3 – *Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Genoa, Italy.*

Рецепторы следовых аминов (trace amines associated receptors, TAARs) представляют собой небольшую группу, относящуюся к рецепторам семейства GPCR. Естественными лигандами данных рецепторов являются такие соединения, как бета-фенилэтиламин, тирамин, октопамин, а также некоторые производные ароматических аминокислот. Наиболее изученным представителем данной группы рецепторов является TAAR1. В многочисленных исследованиях показано, что он вовлечен в работу определенных молекулярных механизмов, ответственных за двигательные и когнитивные функции, а также эмоциональный контроль. Более того показана немаловажная роль TAAR1 рецептора в регуляции функций эндокринной и иммунной систем. Таким образом, TAAR1 является перспективной молекулярной мишенью для создания препаратов от нейропсихических заболеваний, таких как депрессия и шизофрения, а также сахарного диабета.

На сегодняшний день активно ведутся разработки синтетических лигандов рецептора TAAR1 человека. Следовательно, поиск эффективной технологии скрининга синтетических соединений на предмет активации/ингибирования активности TAAR1 рецептора является актуальной задачей.

Целью данной работы являлось проведение скрининга различных лекарственных субстанций на предмет активации TAAR1 рецептора человека и TAAR5 рецептора мыши. В качестве объектов исследования были выбраны следующие коммерческие библиотеки (суммарно порядка 1500 соединений).

Изучение активности данных соединений в отношении исследуемых TAAR рецепторов проводилось по следующей методике BRET. Культуру клеток НЕК293Т выращивали на среде DMEM. Затем клетки котрансфецировали двумя экспрессионными векторами: рchTAAR1 или рcmTAAR5 и рсЕРАС при помощи липофекции по стандартному протоколу. Выращивали на планшетах в течение 36 часов. Затем культуральную жидкость осторожно удаляли при помощи аспиратора, и в каждую лунку последовательно добавляли 70 мкл PBS буфера, 10 мкл 2мМ раствора IBMX и 10 мкл 50 мкМ раствора коэлентеразина h. Затем для определения эффективной концентрации (EC₅₀) добавляли растворы лигандов в разведениях от 1 пМ до 10 мкМ и считывали значения интенсивности люминесценции с максимумами при длинах волн 535 и 480 нм. Затем математически вычисляли BRET ratio, строили кривые зависимости «доза-эффект» и определяли эффективную концентрацию лиганда.

В результате проведенных экспериментов были определено несколько агонистов TAAR1 рецептора и всего лишь 1 агонист TAAR5 рецептора. Для TAAR1 рецептора были найдены уникальные соединения имидазолиновой природы с эффективной концентрацией в пикомолярном и субнанолярном диапазоне. Все они являются агонистами альфа2-адренергического рецептора, что, несомненно, вызывает интерес к функциональной селективности данных соединений и их терапевтических эффектам.



Биобанк СПбГУ. Инфраструктура и наука

Глотов А.С., Насыхова Ю.А., Полев Д.Е., Чекунова Е.М., Серебрякова Е.А., Шувалова А.Р., Михайлова А.А., Золотарева А.Д, Илларионов Р.Р., Вашукова Е.С., Барбитов Ю.А., Предеус А.В., Пакин В.С., Баранов В.С., Чернов Ю.О., Сарана А.М., Щербак С.Г., Глотов О.С.

ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

ФГНБУ «НИИАГиР им.Д.О.Отта», Санкт-Петербург, Россия

ГБ СПб ГБУЗ «Городская больница №40», Санкт-Петербург, Россия

Институт биоинформатики, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: a.glotov@spbu.ru

После триумфальной расшифровки генома человека дальнейшее развитие подходов к анализу индивидуальных биологических особенностей и факторов риска требует развития таких направлений, как индивидуальная и популяционная геномика, транскриптомика, и протеомика. Совокупность этих подходов позволяет перейти к генетической паспортизации и персонализированной медицине. Критическим элементом для такого исследования является наличие большой выборки индивидуальных проб документированного происхождения, доступных для молекулярно-генетического и биохимического анализа высокой разрешающей способности. Базу для этого создают национальные биобанки.

Нами при сотрудничестве СПбГУ, СПб ГБУЗ «Городская больница № 40» и НИИ «АГиР им.Д.О.Отта» и других организаций стартовал систематизированный сбор биообразцов. В соответствии с требованиями ISBER and BVMRI сегодня собрано более 40 тыс. образцов. Планируется к 2019 году иметь более 100 000 образцов.

Несмотря на сбор биообразцов, уже сегодня на базе Биобанка реализуется ряд важных генетических проектов. Одним из таких проектов, является проект «Российские Геномы». Проведено исследование 256 геномов россиян с использованием современного секвенатора HiSeq 4000.

Другим примером реализации возможностей биобанка является проект по исследованию экзомов. Для исследования спектра мутаций был разработан уникальный биоинформатический алгоритм обработки данных (<http://genome.ifmo.ru/snvviewer>). Используя данный алгоритм, было проведено экзомное секвенирование образцов ДНК более 600 пациентов. Используя данный алгоритм, нам удалось существенно увеличить чувствительность NGS теста для некоторых наследственных заболеваний. Данный подход используется для составления практических рекомендаций пациентам. В рамках Научного парка создана база данных, содержащая информацию о мутациях при таких комплексных заболеваниях как СД2 типа, диабет МОДИ, ожирение (<https://biobank.ga>).

Мы полагаем, что создание банков биообразцов, уникальных баз данных генных мутаций, отечественных референсных последовательностей, новых биоинформатических протоколов является необходимым элементом развития персонализированной медицины будущего.

Работа по созданию биобанка поддержана грантом РФФ №14-50-00069, исследования выполнены на базе РЦ «Центр Биобанк» Научного парка СПбГУ.



Диагностика и профилактика редких (орфанных) заболеваний методом NGS

Глотов О.С.^{1,3,5}, Серебрякова Е.А.^{1,3,5}, Туркунова М.Е.⁶, Башнина Е.Б.², Глотов А.С.^{1,3,5}, Барбитов Ю.А.^{1,7}, Предеус А.В.⁷, Полев Д.Е.¹, Дитковская Л.В.⁶, Берсенева О.С.², Тыртова Л.В.⁶, Скородок Ю.Л.⁶, Досовицкая Е.Р.⁴, Лобанова Н.Н.⁶, Тыртова Д.А.⁶, Скобелева К.В.⁶, Полянская М.А.⁴, Цораева Ф.З.⁴, Корытко Т.Е.⁴, Дубинина Т.А.⁴, Платонов В.В.⁴, Шабанова Е.С.³, Иващенко Т.Э.³, Швед Н.Ю.^{1,3,5}, Ефимова О.А.³, Романова О.В.⁵, Федяков М.А.⁵, Сарана А.М.^{1,5}, Щербак С.Г.^{1,5}, Баранов В.С.^{1,3}.

1 – ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Институт трансляционной биомедицины

2 – ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России

3 – ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»

4 – СПб ГБУЗ «Детская городская больница №19 им. К.А. Раухфуса»

5 – ГБ СПб ГБУЗ «Городская больница №40»

6 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России,⁷ Институт биоинформатики

В настоящее время существует серьезный прогресс в лечении пациентов с редкими болезнями. Разработанные препараты не только продлевают жизнь таким больным, но и могут существенно улучшать ее качество. Во многом эффективность лечения пациентов с орфанными болезнями зависит от правильно установленного диагноза. Единственным точным методом, который позволяет четко верифицировать диагноз, является генетический анализ. На сегодняшний момент для оценки эффективности диагностики нами произведено исследование более 650 экзомов пациентов с разными нозологиями. В частности удалось определить выявляемость и спектр мутаций у детей с моногенным сахарным диабетом (МСД-MODY). В исследование были включены пациенты с СД манифестировавшим в возрасте первых 6 месяцев жизни, а также группа пациентов с "мягким" течением СД сохраненной секрецией инсулина, отсутствием диабетогенных аутоантител. При исследовании ДНК пациентов использовался метод полноэкзомного секвенирования. Для изучения кодирующих регионов генов МСД была разработана NGS панель, включающая следующие гены: *HNFI1A*, *GCK*, *HNFI4A*, *HNFI1B*, *PDX1*, *NEUROD1*, *KLF11*, *CEL*, *PAX4*, *INS*, *BLK*, *EIF2AK3*, *RFX6*, *WFS1*, *ZFP57*, *FOXP3*, *KCNJ11*, *ABCC8*, *GLUD1*, *HADH (SCHAD)*, *SLC16A1*, *UCP2*, *INSR*, *AKT2*, *GCG*, *GCGR*, *PPARG*, *PTFI1A*. Биоинформационный фильтринг результатов секвенирования образцов ДНК проводили с помощью программ: «GeneTalk» (<https://www.gene-talk.de/>), «UGENE» (<http://ugene.unipro.ru/>), «Ion Reporter» (<https://ionreporter.lifetechnologies.com/ir/>), «SIFT» (<http://sift.jcvi.org/>), «PolyPhen2» (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), «PAPI» (<http://papi.unipv.it/>). Для ранжирования вариантов использована оригинальная ранее разработанная метрика. Верификация полученных данных проводили методом прямого секвенирования на приборе «Genetic Analyzer 3500» («Applied Biosystems», США). Были исследованы образцы ДНК 72 пациентов с подозрением на наличие МСД. МСД был подтвержден у 51% (n=37). Наиболее часто встречались мутации в гене *GCK*-39% (n=23), у 3 пациентов выявлены патогенные мутации в нескольких генах 4%, *HNFI1A* -2,7% (n=2), *WFS1*-2,7% (n=2), *EIF2AK3*-2,7% (n=2), *PAX4*-1,4% (n=1), *GATA6*-1,4% (n=1), *FOXP3*-1,4% (n=1), *KCNJ11*-1,4% (n=1), *ABCC8*-1,4% (n=1). Частота выявляемости моногенных форм СД в нашей группе выше, чем описано в литературе, и составляет 51%. Высокая выявляемость может быть связана как с особенностями нашей группы, так и с



использованным биоинформатическим подходом. Молекулярно-генетическая верификация диагноза при помощи NGS секвенирования позволяет прогнозировать течение заболевания и вносить коррективы в лечение СД. Таким образом, проведенное исследование демонстрирует эффективность современных методов молекулярной генетики для установления точного диагноза. **Исследование поддержано** Фондом "КАФ" в рамках программы "Альфа-эндо", грантом РФФИ №14-50-00069, полноэкзомное секвенирование выполнена на базе РЦ «Центр Биобанк» Научного парка СПбГУ.



Вычислительные методы для ускорения поиска новых антибиотиков

Гуревич А.А.¹, Михеенко А.А.¹, Шлемов А.Ю.¹, Коробейников А.И.^{1,2}, Mohimani, Н³, Певзнер П.А.^{1,4}

1 – Центр алгоритмической биотехнологии, Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

2 – Математическо-механический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

3 – Department of Computational Biology, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA, USA

4 – Department of Computer Science and Engineering, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA

Расцвет в области обнаружения природных антибиотиков середины XX века сменился периодом затишья длиной в тридцать лет, в течении которого принципиально новые антибиотики обнаружить не удавалось. В то же время чрезмерное и необдуманное использование имеющихся антибиотиков привело к тому, что многие возбудители инфекций стали устойчивы к ним. В результате этого человечество оказалось на грани появления новых заболеваний, для лечения которых у медицины может просто не оказаться лекарств.

Современные методы анализа биологически активных природных соединений постепенно меняют картину к лучшему. Так в 2015 был открыт теиксобактин – вещество, скорее всего являющееся представителем нового класса антибиотиков и способное противостоять болезнетворным бактериям, устойчивым к другим видам противомикробных препаратов (Ling et al., *Nature*, 2015). Запущенная в 2016 платформа Global Natural Products Social (GNPS) molecular networking infrastructure уже успела объединить более миллиарда масс-спектров природных соединений полученных сотнями международных лабораторий при изучении микроорганизмов со всего мира (Wang et al., *Nature Biotechnology*, 2016). Среди этих данных безусловно содержится множество еще не открытых природных антибиотиков, однако нехватка вычислительных методов анализа препятствует их скорейшему обнаружению.

Лаборатория «Центр алгоритмических биотехнологий» в сотрудничестве с Калифорнийским университетом в Сан-Диего (США) и Университетом Карнеги-Меллона (США) разработало ряд программных инструментов для идентификации природных соединений по масс-спектрометрическим данным. Все эти программы представлены как в виде приложений командной строки, так и как веб-приложения GNPS, и были успешно апробированы на миллионах масс-спектров с этой платформы.

Первым выпущенным программным продуктом стал Dereplicator, предназначенный для идентификации масс-спектров, относящихся к известным пептидным природным соединениям, по базе данных (Mohimani et al., *Nature Chemical Biology*, 2017). Результаты работы Dereplicator могут использоваться для существенного сокращения объема анализируемых данных и для предотвращения «переоткрытия» уже известных соединений. В 2017 было выпущено продолжение этого продукта – инструмент VarQuest, способный находить не только известные вещества, но и их модифицированные/мутировавшие варианты, которые зачастую могут оказаться более важными с фармакологической точки зрения (Gurevich et al., *Nature Microbiology*, 2018). Наконец, в 2018 был разработан Dereplicator+ – адаптация Dereplicator для работы с гораздо более широким набором классов природных соединений, которые значительно сложнее идентифицировать, чем вещества имеющие пептидную структуру (Mohimani et al., принята в *Nature Communications*, 2018).

Данная работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-50-00069).



Наноловушки для хемокинов и белка gp120 ВИЧ на основе биodeградируемых полимерных наночастиц с биомиметической поверхностью

Гурьянов И.А.¹, Зашихина Н.Н.^{1,2}, Коржиков-Влах В.А.¹, Коржикова-Влах Е.Г.^{1,2}, Тенникова Т.Б.^{1,2}

1 – Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

2 – Институт высокомолекулярных соединений российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Современная медицина все более фокусируется на лечении сложных и комплексных заболеваний с помощью методов, имитирующих природные процессы. Использование рецепторов-ловушек, которые имеют только связывающие лиганд фрагменты и не способны к передаче сигнала, является чрезвычайно многообещающим подходом для создания биомиметических поверхностей, которые распознают и селективно связывают комплементарные лиганды, модифицируя таким образом их биологическую активность [1]. В частности, искусственные наносистемы, которые функционируют как рецептор CCR5 могут быть использованы для лечения не только воспалительных и аутоиммунных заболеваний, но также ВИЧ инфекции и сопутствующих нарушений метаболизма, вызванных присутствием в организме вирусных белков. В данной работе мы описали принцип построения биомиметических систем, которые способны к высокоаффинному связыванию белка gp120 ВИЧ и некоторых воспалительных хемокинов, в частности, Rantes. Как Rantes, так и gp120 взаимодействуют с гликозаминогликанами, такими как гепарин, и связываются с N-концевой частью (Nt) и второй внеклеточной петлей (ECL2) рецептора CCR5. На основе наночастиц поли(молочной кислоты) были получены многослойные наноловушки, несущие на поверхности гепарин, а также фрагменты рецептора Nt и ECL2 с концевыми олиголизинными последовательностями для возможности электростатического взаимодействия компонентов наносистемы. Присутствие наночастиц в клеточной среде полностью устраняло активирующий эффект Rantes и уменьшало адгезию моноцитов к эндотелиальным клеткам вследствие удаления хемокина. Было обнаружено, что пептид ECL2 сам способен препятствовать адгезии моноцитов, в отличие от Nt. Связывание белка gp120 ВИЧ было исследовано методом плазмонного резонанса с использованием пептида, представляющего собой его петлю V3 как модель. Как и в случае экспериментов по адгезии моноцитов, ECL2 показал более высокую аффинность к V3, чем Nt ($K_D = 3.68 \times 10^{-8}$ М и 1.38×10^{-6} М, соответственно). Анализ результатов позволил предположить конформационные изменения пептидов при связывании. Было также показано, что для наиболее эффективного взаимодействия в структуре наноловушек необходимо присутствие как гепарина, так и пептидов ECL2 и Nt.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-50-00069, направление 05-109).

Литература

- [1] A. Mantovani et al. *Nature Rev.* 2006, 6, 907.
- [2] Marques et al. *Expert Opin. Ther. Targets* 2013, 17, 1439.
- [3] A. Kuzmina et al. *PLoS One*, 2015, 10, e0144043.
- [4] Guryanov et al. *Nanomedicine: NBM* 2017, 13, 2575.



GAligner: инструмент для эффективного и точного выравнивания длинных ридов на граф сборки

Дворкина Т. Е., Антипов Д. Ю.¹, Нурк С. Ю.¹, Коробейников А.И.^{1,2}, Певзнер П.А.^{1,3}

1 – Центр алгоритмической биотехнологии, Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

2 – Математическо-механический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

3 – Department of Computer Science and Engineering, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA

На начальном этапе для представление сборки генома часто используются графы последовательностей. Инструменты для точного выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей на такие графы могут быть полезны в различных областях, таких как гибридная сборка, исправление ошибок в ридов, поиске вариаций, идентификации частично собранных генов и разделении гаплотипов. В то же время существующие в настоящее время решения данной задачи имеют значительные ограничения. В данной работе мы представляем GAligner (GA) — инструмент для локального выравнивания последовательностей ДНК на граф сборки. В частности, GAligner может быть использован для того, чтобы выравнивать на граф сборки длинные последовательности с высоким процентом ошибок секвенирования. Новый алгоритм был протестирован на различных наборах данных, содержащих длинные риды PacBio и ONT, и показал высокий процент точных выравниваний на графах сборки различной сложности.

Данная работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-50-00069).



Влияние агониста рецепторов следовых аминов 1-го подтипа на активное внимание у крыс

Доротенко А.Р.¹, Бортников Н.С.¹, Гайнетдинов Р.Р.², Суханов И.М.¹

1 – Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет

2 – Санкт-Петербургский государственный университет, Институт трансляционной биомедицины

Введение Трудности поддержания и концентрации внимания сопровождаются рядом психических расстройств, самым распространенным из которых является синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ). По данным ВОЗ уровень заболеваемости СДВГ составляет 5,0-7,1%, а за последние 8 лет количество пациентов с таким диагнозом увеличилось на 42%. Препаратами первой линии для лечения СДВГ до сих пор остаются психостимуляторы, препараты, обладающие ярко выраженным аддитивным потенциалом. Поэтому поиск новых мишеней для терапии СДВГ - актуальная задача современной нейропсихофармакологии. Одной из таких мишеней может быть рецептор, ассоциированный со следовыми аминами, 1-го подтипа (TAAR1). В предшествующих исследованиях агонисты этих рецепторов продемонстрировали способность снижать гиперактивность у крыс-нокаутных по гену дофаминового транспортера, доклинической модели СДВГ.

Цель Изучить эффекты высокоселективного частичного TAAR1-агониста RO5263397 в тесте распознавания зрительного стимула, тесте, который используют для оценки поддержания внимания в экспериментах *in vivo*.

Материалы и методы Исследование проводили на группе самцов крыс стока Wistar (n=6) в оперантных камерах Скиннера, оснащенных двумя выдвигающимися педалями, лампой общего освещения и автоматизированной кормушкой. Также над каждой pedalью была расположена сигнальная панель с тремя цветными лампочками в качестве визуального стимула. Животных, предварительно обученных нажимать на pedalь в оперантных камерах за пищевое подкрепление, обучали следить за сигнальными лампочками. Если сигнальные лампочки на панелях не загорались (“несигнальная” попытка), то животному для получения пищевого подкрепления необходимо было нажать на одну pedalь, если загорались (“сигнальная” попытка), то на другую. Продолжительность визуального стимула течение каждой экспериментальной сессии меняли в псевдослучайном порядке (500; 30 и 10 мс). Тесты начали после стабилизации поведения животных. RO5263397 (0,3; 1; 3; 6 мг/кг) или растворитель вводили в.б. за 15 минут до начала экспериментальной сессии, порядок тестирования различных доз препаратов определяли по схеме “латинский квадрат”.

Результаты Выполнение задачи зрительного распознавания зависело от продолжительности предъявляемого стимула. Введение RO5263397 не влияло на выполнение задачи при продолжительности стимула 500 и 30 мс, однако, когда длительности стимула составляла 10 мс, под действием RO5263397 у крыс увеличивалось относительное число правильных ответов в “сигнальных” попытках, достигая уровня статистической значимости для дозы 3 мг/кг.

Заключение Полученные данные указывают, что активация TAAR1 может увеличивать поддержание внимания у крыс. Эти результаты подтверждают, что TAAR1-агонисты могут быть потенциальным средством терапии как СДВГ, так и других заболеваний, сопряженных с нарушением внимания. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-50-00069.



Эффект амилоидизации на транспозицию дрожжевого ретротранспозона Tu1

Зелинский А.А.¹, Сергеева А.В.², Рубель А.А.¹, Чернов Ю.О.^{1,3}

1 – Санкт-Петербургский государственный университет, Научная лаборатория биологии амилоидов и институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербург, Россия

2 – Санкт-Петербургский государственный университет, Кафедра генетики и биотехнологии,

Санкт-Петербург, Россия;

3 – Технологический институт Джорджии, Факультет биологических наук, Атланта, Джорджия, США

Ретротранспозоны – уникальная группа мобильных генетических элементов, характерным этапом размножения которых является обратная транскрипция, при которой на матрице РНК синтезируется ДНК. Ретротранспозоны являются нормальной составляющей генома эукариот. Однако также существуют ретровирусы, по-видимому, являясь потомками ретротранспозонов. Эти вирусы имеют важное медицинское и ветеринарное значение.

Амилоиды – белковые агрегаты фибриллярной природы, для которых характерно формирование межмолекулярных кросс-β структур, β-арок, устойчивость к детергентам и протеазам, а также склонность к самосборке.

С помощью биоинформатического алгоритма ArchCandy нами был проведён анализ полипротеина Tu1 ретротранспозона с целью выявления в нём последовательностей, склонных к формированию амилоидов. Подходящий по характеристикам домен был найден в составе интегразы, фермента, который является ключевым для нормального функционирования ретротранспозона, так как отвечает за встраивание ДНК-копии мобильного элемента в геномную ДНК.

Нами было показано, что исследуемый домен интегразы Tu1, сшитый с N-доменом белка Sup35 способен нуклеировать прион [*PSI*⁺] в системе фенотипической детекции нонсенс-супрессии и формировать детергент-устойчивые агрегаты. Также, исследуемый домен показал формирование агрегатов при использовании флуоресцентной микроскопии.

Также нами было показано влияние исследуемого амилоидогенного домена на способность полноразмерного ретротранспозона Tu1 осуществлять транспозицию.

Параллельно, нами были проанализированы патогенные вирусы человека (вирус иммунодефицита, гепатита С и вирус Зика). Для капсидного белка р24 вируса иммунодефицита человека нам удалось показать формирование агрегатов с помощью флуоресцентной микроскопии. В настоящее время проводится биохимический анализ амилоидогенного потенциала домена р24.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (грант 14-50-00069), часть работы выполнена при поддержке гранта СПбГУ (проект 15.61.2218.2013). Работа выполнена при участии РЦ «РМИКТ», «Биобанк» и «Хромас» технологического парка СПбГУ.



Влияние нонсенс мутаций в гене *SUP35* на свойства приона [*PSI*⁺]

Землянко О.М.^{1,2,3}, Трубицина Н.П.¹, Бондарев С.А.^{1,2}, Журавлева Г.А.^{1,2}

1 – СПбГУ, каф. генетики и биотехнологии

2 – СПбГУ, лаб. биологии амилоидов

3 – СПб НЦ РАН, отд. биологии

Терминацию трансляции у эукариот осуществляет белок Sup45p (eRF1) в комплексе с белком Sup35p (eRF3) (Zhouravleva et al., 1995; Stansfield et al., 1995). Белок Sup35 способен переходить в нерастворимое агрегированное состояние, образуя фактор [*PSI*⁺] в клетках дрожжей. Это приводит к частичной инактивации eRF3, к снижению точности терминации трансляции и появлению нонсенс-супрессии. Мутации в гене *SUP35* также вызывают нонсенс-супрессию. Ранее были получены нонсенс-мутанты (*sup35-n*), характеризующиеся сниженным количеством полноразмерного белка Sup35, который мог синтезироваться в результате прочтения преждевременного стоп-кодона в гене *SUP35* (Chabelskaya et al., 2004). Штаммы, несущие мутации *sup35-n* имеют супрессорный фенотип и оказываются жизнеспособны в штамме [*psi*]. В этой работе изучали четыре мутации, затрагивающие различные участки гена *SUP35*. Было показано, что в гаплоидных клетках в сочетании с фактором [*PSI*⁺] эти мутации демонстрируют синтетическую летальность схожую с мутациями *sup45-n* (Kiktev et al., 2007). Этот эффект можно объяснить критическим снижением уровня функционального белка Sup35 в клетках, содержащих два сильных нонсенс-супрессора. Тем не менее, диплоидные клетки несущие одновременно некоторые *sup35-n* в сочетании с [*PSI*⁺] оказывались жизнеспособны. Присутствие мутантных аллелей *sup35-n* в сочетании с аллелью дикого типа *SUP35* приводило к изменению свойства [*PSI*⁺], а именно размер агрегатов и уровень нонсенс-супрессии. Клетки, несущие *sup35-n*, кроме небольшого количества полноразмерного белка Sup35 содержат также и укороченный фрагмент, который потенциально может служить затравкой для формирования приона [*PSI*⁺]. В соответствии с этой идеей мы показали, что некоторые мутации *sup35-n* способны индуцировать возникновение [*PSI*⁺] *de novo*. Механизмы обеспечивающие различия в жизнеспособности гаплоидов и диплоидов пока неясны.

Работа поддержана грантом РФФ 18-14-00050, а также ресурсным центром СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».



Генотоксические эффекты при совместной обработке клеток дрожжей *S. cerevisiae* мутагенами с различным механизмом действия

Зотова И.В.^{1,2}, Степченкова Е.И.^{1,2}, Павлов Ю.И.³

1 – Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, РАН

2 – Санкт-Петербургский государственный университет

3 – Медицинский центр университета штата Небраска (UNMC), Омаха, США

В клетках всех живых организмов темп мутационного процесса строго контролируется и поддерживается на оптимальном уровне. При изменении условий обитания популяции увеличение частоты мутагенеза может быть адаптивно, поскольку при этом повышается генетическое разнообразие, обеспечивающее выживание наиболее приспособленных особей. Негативным последствием мутаций является нарушение реализации наследственной информации, часто приводящее к возникновению различных заболеваний человека и животных. Несколько различных мутагенных процессов могут служить причиной возникновения мутаций. Это экзогенные генотоксические факторы, нарушения работы ДНК-полимераз, разбалансировка пула нуклеотидов и нарушение экспрессии эндогенных мутаторов. Влияние отдельных мутагенов на живые организмы хорошо изучено. В естественных условиях живые организмы одновременно испытывают множественные воздействия, в том числе, генотоксические, однако данных о совместном воздействии нескольких мутагенных факторов на клетки недостаточно.

В рамках исследования мы изучили генотоксические эффекты, возникающие при совместном действии двух мутагенных факторов на клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Одним из использованных нами мутагенных факторов является фермент семейства АРОВЕС/АID цитозин-дезаминаза LASID морской миноги *Petromyzon marinus*. Цитозин-дезаминазы есть у человека и многих животных, в норме они работают в различных тканях, обеспечивая защиту от вирусов и участвуя в формировании иммунитета. Эти белки дезаминируют цитозин в ДНК и РНК с образованием урацила. Системы репарации вырезают урацил из ДНК и восстанавливают ее прежнюю последовательность. При недостаточной эффективности систем репарации или нарушении контроля активности цитозин-дезаминаз их мутагенное действие может распространяться на весь геном и приводить к злокачественной трансформации клеток.

Дрожжевые клетки с контролируемой экспрессией цитозин-дезаминазы LASID были обработаны: 6-гидроксиламинопурином (ГАП) или УФ-излучением. Эти хорошо изученные мутагены обладают различным механизмом действия и активируют разные системы репарации в клетке. Получены данные о частоте мутаций, возникающих при совместном действии цитозин-дезаминазы и двух экзогенных мутагенов. Выявлено аддитивное возрастание частоты мутагенеза при совместном действии дезаминазы LASID как при воздействии УФ, так и ГАП.

Работа выполнена по теме Государственного задания № 0112-2018-0016 и поддержана грантом РФФИ 14-50-00069. Авторы благодарят Ресурсные центры СПбГУ «Биобанк» и «РМиКТ».



Метки ЭПР в качестве зонда для исследования белковых систем: о чём говорят спектры

Измайлов С.А.¹, Рабдано С.О.¹, Подкорытов И.С.¹, Cunningham T.F.², Jaroniec C.P.³, Saxena S.², Скрынников Н.Р.^{1,4}

1 – *Laboratory of Biomolecular NMR, Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg 199034*

2 – *Department of Chemistry, University of Pittsburgh, Pittsburgh PA 15260, USA*

3 – *Department of Chemistry & Biochemistry, Ohio State University, Columbus OH 43210, USA*

4 – *Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette IN 47906, USA*

Существует обширный круг белковых систем, для которых полноценный структурный анализ (с помощью рентгеновской кристаллографии или спектроскопии ЯМР) является крайне затруднительным или даже практически неосуществимым. К этой категории относятся многие трансмембранные рецепторы, молекулярные машины, амилоидные фибриллы и пр. Для подобных систем полезная структурная информация зачастую может быть получена с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса. Для этого, как правило, готовится рекомбинантный вариант белка, содержащий один и только один (доступный) остаток цистеина. Затем белок подвергается химической модификации – а именно, к тиольной группе цистеина прикрепляется ЭПР метка (например, 2,2,5,5-tetramethyl-1-oxyl-3-methyl methanethiosulfonate, MTSL). Далее белок, меченый MTSL, может быть интегрирован в сколь угодно сложную белковую систему, после чего полученный образец используется для записи спектра ЭПР. При этом форма спектра отражает характер окружения метки: узкие и симметричные спектральные линии соответствуют динамичному окружению, тогда как уширенные и асимметричные спектры соответствуют статичному, жёсткому окружению. Однако помимо такого рода общих принципов более детальная информация о взаимосвязи между белковой структурой/динамикой и формой ЭПР спектров в настоящее время отсутствует.

С тем чтобы прояснить эту взаимосвязь мы обратились к методу Молекулярной Динамики. Нами были записаны траектории МД для шести вариантов небольшого модельного белка GB1, несущего метку MTSL. Совокупная длина этих траекторий составляет 60 микросекунд. Данные МД были использованы для моделирования спектров ЭПР с применением двух методов: (1) прямого интегрирования уравнения Лиувилля - фон Неймана для эволюции спиновой матрицы плотности и (2) приближенной теории Редфилда. Это является значительным шагом вперёд по сравнению с предшествующими исследованиями такого рода, в которых спектр ЭПР свободной метки MTSL был сосчитан на основе траектории длительностью в 0.2 микросекунды. Рассчитанные нами спектры находятся в хорошем согласии с экспериментальными данными, полученными Сунилом Саксена и его сотрудниками для образцов GB1 в вязкой матрице. С целью дальнейшего сравнительного анализа нами были приготовлены шесть различных образцов GB1 для последующего экспериментального исследования с применением ЭПР спектроскопии (предусматриваются измерения в водном буфере, а также в микрокристаллической форме).

Данные МД позволяют нам охарактеризовать взаимосвязь между структурной динамикой белка и формой ЭПР спектра. Для этой цели мы специальным образом обрабатываем траектории, последовательно "отключая" различные динамические моды. К примеру, мы имеем возможность "отключить" (стохастическое) вращение белка как целого. Такого рода анализ показывает, что форма спектра ЭПР в первую очередь определяется



объёмом свободного пространства доступного для боковой цепи цистеина с прикрепленной к ней меткой MTSL.

Данная работа проводится при поддержке гранта РФФИ 15-14-20038.



Использование первичной нейрональной культуры для репрограммирования клеток.

Католикова Н.В.^{1,2}, Гайнетдинов Р.Р.^{1,2}.

1- Сколковский Институт Науки и Технологий, Москва, Россия

2- Институт Трансляционной Биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Репрограммирование клеток - это метод, позволяющий получить один тип клеток из другого. Впервые данный метод был описан в 2006 году в статье Шинья Яманака. Описанный им метод позволяет получить плюрипотентные клетки (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК)) из фибробластов за счет оверэкспрессии в них 4х транскрипционных факторов. Полученные таким образом клетки могут быть дифференцированы в любые типы соматических клеток, включая нейроны.

В 2010 году была опубликована статья Томаса Виербухена, в которой был описан метод прямого репрограммирования, позволяющий получить один тип клеток из другого, минуя стадию плюрипотентности, что исключает все риски, которые связаны с использованием плюрипотентных клеток. Клетки, полученные путем репрограммирования или дифференцировки из плюрипотентных клеток могут быть использованы для лечения заболеваний, связанных с гибелью определенного типа клеток.

Болезнь Паркинсона (Parkinson's disease (PD)) – это нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга. Метод прямого перепрограммирования может быть использован для получения дофаминергических нейронов, что может стать основой для заместительной терапии БП.

В первой части нашей работе мы получили полицистронные лентивирусные частицы, несущие три фактора *Ascl1*, *Lmx1a* и *Nurr1*. Мы показали, что репрограммирование с использованием данных частиц эффективно для получения дофаминергических нейронов из эмбриональных фибробластов мыши, однако эффективность данного процесса была не высока. На втором этапе мы создали вирусные частицы, несущие *Ascl1*, *Nurr1*, *Lmx1a* по отдельности. При использовании данных вирусных частиц было получено значительно большее увеличение экспрессии указанных факторов в культурах клеток. Используя данные частицы мы планируем повторить и проверить эксперименты, сделанные при помощи полицистронных вирусов на культурах гиппокампа и кортекса мыши.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ «Трансляционная биомедицина в СПбГУ», направление «Трансгенные модели заболеваний человека на экспериментальных животных» №14-50-00069.



Изучение амилоидогенного белка РНСЗ на клеточной культуре млекопитающих НЕК293

Качкин Д.В.¹, Зелинский А.¹, Рубель А.А.¹, Чернов Ю.О.^{1,2}

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

2 – Georgia Tech, Atlanta, USA

Амилоидами называют высокоупорядоченные белковые агрегаты фибриллярной природы, имеющие в своем составе структуры обогащенные β -слоями и способные катализировать присоединение к себе мономерных молекул того же белка с изменением их нормальной конформации. Амилоиды особенно интересны в связи с вызываемыми ими заболеваниями у человека и животных, которых на сегодняшний день насчитывается более 50-ти, и все они являются неизлечимыми.

С ростом количества работ, посвященным амилоидным белкам стало понятно, что амилоиды могут выполнять и определенные функции в организме. Такие амилоиды называют функциональными и они были обнаружены в разных группах живых организмов - от бактерий до человека.

В лаборатории Биологии амилоидов благодаря с помощью дрожжевой тест системы биоинформатическим методам и дрожжевой модели были показаны амилоидогенные свойства белка человека - РНСЗ, предсказанного ранее при помощи биоинформатического алгоритма ArchCandy.

РНСЗ является одним из белков группы поликомб (PcG) - комплекса белков необходимых для поддержания репрессивного состояния многих генов, включая Нох-гены во время развития организма.

Данная работа направлена на изучение амилоидных свойств белка РНСЗ в системе клеточных культур человека НЕК293, а также изучение влияния агрегации этого белка на паттерн экспрессии генов в изучаемой культуре клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-50-00069. Для выполнения исследований использовалась приборная база ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС», «РМиКТ» и «Биобанк» научного парка СПбГУ.



Паттерны экспрессии TAAR5 методом LacZ у трансгенных животных

Козлова А., Гайнетдинов Р.

Санкт-Петербургский Государственный Университет, Институт Трансляционной Биомедицины

Семейство рецепторов, связывающих следовые амины (trace amines associated receptors, TAAR), было впервые описано в 2001 году. Ранние исследования, посвященные изучению влияния эндогенных следовых аминов на физиологические процессы в организме, а также их роли при развитии различных психических и нейродегенеративных заболеваний, остались незамеченными в связи с низкими концентрациями соединений, а также отсутствием их известных рецепторов. Открытие семейства рецепторов TAAR изменило представление о физиологическом значении бета-фенилэтиламина, октопамина, тирамина, триптамина и т.д., как о нейромодуляторах и нейротрансмиттерах нервной системы позвоночных¹. Несмотря на актуальность исследований, до сих пор хорошо изучен только TAAR1². В последнее время особый интерес проявляется и к другим членам семейства TAAR рецепторов, в частности, к TAAR5.

Наше исследование было направлено на изучение паттернов экспрессии гена рецептора TAAR5 в мозге взрослых мышей. Для этих целей использовалась линия трансгенных мышей, нокаутных по гену TAAR5. Она была создана направленной вставкой гена lacZ в ген TAAR5 при помощи системы гомологичной рекомбинации Cre-lox. Данный метод позволил создать линию, особенностью которой является использование качественной реакции на β-галактозидазу, которая экспрессируется под промоутером гена TAAR5. Для определения паттернов экспрессии рецепторов срезы мозга нокаутных мышей обрабатывали хромогенным субстратом β-галактозидазы – X-Gal, с последующим визуальным анализом окрашенных участков. Для приготовления срезов были использованы мыши дикого типа и нокаутной линии, с последующей перфузией и фиксацией мозга в течение 1.5 часов в 4% формальдегиде. Срезы толщиной в 50 мкм были получены на криостатирующем микротоме Leica CM-3050S. Полученные срезы также использовались в иммунофлуорисцентном исследовании антителами к β-галактозидазе.

Методом LacZ нами впервые было показано, что TAAR5 экспрессируется в гиппокампе (CA1, CA2, CA3), таламусе (перевентрикулярные и вентрикулярные ядра), пириформной коре, прилежащем ядре, обонятельном бугорке, наружной капсуле, полиморфном слое зубчатой извилины и stratum radiatum гиппокампа. Окрашивание хондроэпендимцитов характерно и для линий дикого типа, что говорит об экспрессии собственной β-галактозидазы клетками эпендимы желудочков мозга.

Таким образом, TAAR5 экспрессируются преимущественно структурами лимбической системы, что может быть важным аспектом для определения функциональных особенностей рецепторов в формировании памяти, эмоционального состояния и психических заболеваний.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ «Трансляционная биомедицина в СПбГУ», направление «Трансгенные модели заболеваний человека на экспериментальных животных» N14-50-00069.

1. Beth Borowsky,* Nika Adham and all.; Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors; PNAS; 98(16): 8966–8971; 2001

2. Muhammad Zahid Khana, *, Waqas Nawaz; The emerging roles of human trace amines and human trace amine-associated receptors (hTAARs) in central nervous system; Biomedicine & Pharmacotherapy 83 (2016) 439–449, 2016



3. Lothar Lindemann and all.; Trace Amine-Associated Receptor 1 Modulates Dopaminergic Activity; The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics; 324:948–956, 2008



Анализ состояния микрофлоры кишечника после лечения дисбиоза аутопробиотиками
Кондратенко Ю.Д.¹, Суворов А.Н.^{1, 2}, Карасева А.Б.², Котылева М.П.², Лавренова Н.С.²,
Коробейников А.И.¹, Козырев П.А.¹, Леонтьева Г.Ф.², Крамская Т.А.², Кудрявцев И.В.²,
Лapidус А.Л.¹, Ермоленко Е.И.^{1,2}

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

2 – Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Болезни и стресс часто нарушают нормальное состояние микрофлоры, вызывая дисбиоз. Лечение дисбиоза может помочь ослабить симптомы заболевания и ускорить выздоровление. Для лечения дисбиоза применяют специальные препараты микроорганизмов – пробиотики и аутопробиотики. Пробиотики – это массово производимые препараты, которые должны помогать широкому кругу потребителей. Аутопробиотики – препараты, создаваемые индивидуально с помощью культивации штаммов, образцы которых берут у конкретного пациента. При этом предполагается, что штаммы, уже обитающие в организме индивида и приспособленные к нему, должны удерживаться в организме лучше, чем другие микробы. В этой работе мы исследовали влияние аутопробиотических препаратов на восстановление микрофлоры крыс после индуцированного антибиотиками дисбиоза. Исследованные аутопробиотики включали: индигенные культуры лактобацилл, бифидобактерий, энтерококков, смесь лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков, раствор фекалий, фекальную микробиоту, культивированную единым пулом в анаэробных условиях. Дисбиоз индуцировали применением ампициллина и метранидазол в течение трех дней. Экспериментальные группы включали: крыс, получавших антибиотики в течение трех дней (группа 3ab), крыс, получавших антибиотики в течение трех дней, а затем – аутопробиотики в течение пяти дней (группы 1b, bi, en, mix, fe и an), крыс, получавших антибиотики в течение трех дней, а потом в течение пяти дней физраствор (группа 8ab), а также контрольную группу, получавшую физраствор в течение всех восьми дней эксперимента (группа k). Для исследования состояния микрофлоры кишечника подопытных животных из образцов фекалий выделяли ДНК. Далее секвенировали переменные сегменты V3 и V4 рибосомальной РНК. Для выделения операциональных таксономических единиц (OTU) прочтения кластеризовали с помощью утилит CD-HIT-OTU-MiSeq. Для аннотации полученных кластеров использовали базу бактериальных генетических последовательностей Greengenes v.13.5. Анализ профилей представленности микробных групп, PCA и расчет расстояний между образцами методом Unifrac показали, что все исследованные аутопробиотики сдвигали состояние микрофлоры от дисбиотического (3ab) к контрольному (k) более выражено, чем микрофлора восстанавливалась после дисбиоза естественным путем (8ab). Эти данные говорят, что аутопробиотики могут ускорить восстановление микрофлоры после дисбиоза и представляют собой перспективные препараты для дальнейшего исследования.

Данная работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-50-00069).



Наносистемы на основе амфифильных сополимеров для доставки лекарств различной природы

Коржикова-Влах Е.Г.^{1,2}, Зашихина Н.Н.^{1,2}, Левит М.Л.¹, Волокитина М.В.¹, Шаройко В.В.¹, Тенникова Т.Б.¹

1 – *Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

2 – *Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

В настоящее время значительный интерес в области создания эффективных терапевтических средств уделяется разработке систем доставки лекарств. Среди широкого многообразия материалов органической и неорганической природы полимерные микро- и наночастицы имеют несомненный ряд преимуществ: (i) возможность высокой загрузки препарата внутрь полимерных частиц, (ii) возможность выбора природы полимера, позволяющая регулировать скорость высвобождения лекарственного вещества, (iii) вариация функциональных групп полимера, обеспечивающая присоединение тех или иных векторов для адресной доставки лекарств. Кроме того, полимерная оболочка позволяет (iv) защитить лекарство от преждевременной инактивации, а организм от неспецифического системного действия.

Одним из простых и удобных способов получения полимерных частиц является самоорганизация амфифильных статистических и блок-сополимеров. Благодаря наличию в своей структуре гидрофильных и гидрофобных фрагментов, различию в их природе и соотношении, данный тип полимеров способен к самоорганизации в частицы различной морфологии, а именно, сферические и цилиндрические мицеллы, а также полимеросомы.

В данной работе авторами осуществлен синтез ряда амфифильных статистических и блок-сополимеров различного состава: (i) на основе гидрофильных и гидрофобных *L*-аминокислот; (ii) на основе гидрофильных *L*- и гидрофобных *D*-аминокислот; (iii) на основе гидрофильного синтетического гликополимера и различных гидрофобных аминокислот; (iv) на основе гидрофильного синтетического гликополимера и гидрофобных холестерин-содержащих полимеров. Все полученные сополимеры были охарактеризованы с использованием современных физико-химических методов с точки зрения молекулярно-массовых характеристик и состава (гельпроникающая хроматография, ¹H ЯМР, ИК-спектроскопия, ВЭЖХ анализа). Формирование частиц осуществляли методом инверсии фаз. В зависимости от природы и состава сополимера наблюдалось формирование частиц различной морфологии, а именно, сферических мицелл или полимеросом. Полученные наносистемы характеризовались различной скоростью биodeградации, что на практике может позволить добиться нужной скорости высвобождения препарата. Все наноматериалы были протестированы на наличие цитотоксичности (МТТ, тест с трипановым синим) и способности проникать в клетки (флуоресцентная микроскопия).

Полученные системы были использованы для инкапсулирования веществ различной природы: (i) сильнозаряженных (пептиды, нуклеиновые кислоты), (ii) гидрофобных (таксаны, стероидные гормоны), (3) амфифильных (люминесцентные красители, цитостатики). Изучены особенности инкапсулирования тех или иных веществ в разработанные полимерные наносистемы, установлены предельные количества загружаемых препаратов, а также эффективность инкапсулирования. Изучены профили высвобождения



препаратов в модельных условиях. В экспериментах на культурах клеток показан положительный эффект инкапсулированных лекарственных форм.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-50-00069, направление 05-109).



Наногели на основе полисахаридов для доставки низкомолекулярных лекарств, белков и полинуклеотидов

Коржииков-Влах В.А., Пилипенко Ю.М., Катернюк Ю.В., Тенникова Т.Б.

*Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии
v.korzhiikov-vlakh@spbu.ru*

Разработка систем направленной доставки лекарств на основе биосовместимых и биodeградируемых полимеров, представляет собой быстро развивающуюся область современной науки. В качестве подобных систем, как правило, используют частицы различной химической природы и морфологии. Развитие обсуждаемой научной области позволяет сформулировать новые задачи, которые должны быть решены при создании систем доставки лекарств. В частности, в ряде случаев необходимо обеспечить проникновение лекарства внутрь клетки, а затем «индуцировать» его быстрое высвобождение. Это может представлять интерес, как для увеличения внутриклеточной локализации низкомолекулярных препаратов, так и для доставки биомакромолекул действующих на генетический аппарат клетки. Учитывая сказанное выше, необходимо выделить относительно новый тип наночастиц, называемый «наногелями». Наногели формируют на основе гидрофильных макромолекул природного или синтетического происхождения, путём создания физических или ковалентных сшивок. Наногели представляют собой мягкий тип наночастиц, способных реагировать на внешние условия. В этом смысле они очень похожи по свойствам на живые системы, в частности, на межклеточный матрикс соединительной ткани. Кроме этого, они имеют, как правило, реакционно-способные группы, пригодные для химической модификации с целью придания необходимых свойств: дополнительное сшивание, связывание таргетизирующих лигандов и т.п.

Интерес представляет инкапсулирование и контролируемое высвобождение малых молекул, белков и РНК из наногелей. Особое внимание привлекает возможность высвобождения, индуцируемого внешними условиями.

В представляемом исследовании мы создали наногели на основе альгината натрия, хитозана и гепарина. Тщательно изучены условия формирования наночастиц с узким распределением по размерам. Размеры получаемых наногелей лежат в пределах 50 – 300 нм. Морфология частиц изучена методами сканирующей, просвечивающей электронной и атомно-силовой микроскопии.

Разработаны методы эффективного инкапсулирования в наногели малых молекул, белков и полинуклеотидов. Ионная природа полисахаридов использована для создания рН-чувствительных систем, высвобождающих инкапсулированные вещества только при определенных значениях рН среды. Для получения термочувствительных наногелей синтезированы графт-сополимеры гепарин-поли(N-изопропилакриламид). Фоточувствительные наногели сформированы с использованием специально синтезированного линкера – 2-(4-(2-(2-аминоэтиламино)пропаноил)фенил)уксусной кислоты. Изучены размеры, физико-химические свойства и индуцируемое внешними условиями высвобождение модельных веществ.

Для оценки возможности использования полученных наногелей в клинической практике, изучили их влияние на жизнеспособность клеточных культур и первичных клеток. Кроме этого, с использованием флуоресцентных маркеров изучено проникновение наногелей внутрь клеток.



Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда
(соглашение № 14-50-00069, направление 05-109).



ДНК-диагностика в семьях больных семейной гиперхолестеринемией из Петрозаводска

В.А.Корнева¹, Р.З.Мургазина^{2,3}, Т.Ю.Кузнецова³, М.Ю.Мандельштам³, Б.В.Васильев³

1 – ФГБОУ ВПО “Петрозаводский государственный университет”, Петрозаводск;

2 – ФГБОУ ВПО “Санкт-Петербургский государственный университет”, Санкт-Петербург;

3 – ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург.

Гиперхолестеринемия – один из недооцененных факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний в России, в т.ч. за счет неизученной распространенности моногенной семейной гиперхолестеринемии (СГХС) в стране. Это заболевание вызвано снижением скорости удаления липопротеинов низкой плотности (ЛНП) из кровотока вследствие мутаций в гене специфического рецептора. У больных СГХС наблюдается повышение в плазме крови уровня холестерина, ассоциированного с ЛНП, и развитие атеросклеротической болезни. В мире описано более 1000 мутаций этого гена, а в России – более 60. Ранняя ДНК-диагностика данного заболевания позволяет своевременно начать лечение и избежать осложнений в виде инфарктов миокарда и мозговых инсультов. ДНК-диагностика требует знания спектра мутаций в отдельных регионах. Мы провели анализ ДНК родственников пациентов из Петрозаводска с ранее обнаруженными мутациями с использованием ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), а также поиск новых мутаций в гене рецептора ЛНП с помощью SSCP-анализа (анализ конформационного полиморфизма однонитевых фрагментов ДНК) и секвенирования. Были охарактеризованы три мутации гена рецептора ЛНП, ранее не встречавшиеся на северо-западе России. Из них одна р.W620S до этого не была описана в литературе, мутация р.E408K найдена у пациента впервые в России, третья мутация р.W433R ранее была описана у русской пациентки из Москвы. Для мутаций р.E408K и р.W443R показали сегрегацию в родословных вместе с высоким уровнем холестерина и ксантомами.

Таким образом, в нашей работе были обнаружены несколько ранее не описанных в данном регионе мутаций в гене рецептора ЛНП, которые потенциально могут иметь диагностическое значение, и показана эффективность ПДРФ-анализа для диагностики семейной гиперхолестеринемии.



Индукция агрегации амилоидогенного белка *in vitro* эндогенными амилоидными агрегатами из клеток дрожжей

Куличихин К.Ю.^{1,5}, Орлов В.М.², Рубель А.А.^{2,3}, Чернов Ю.О.^{1,2,4}

1 – Лаборатория геномных и протеомных исследований, Институт трансляционной биомедицины СПбГУ, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

2 – Научная лаборатория биологии амилоидов СПбГУ, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

3 – Кафедра генетики и биотехнологии СПбГУ, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

4 – Технологический институт Джорджии, Атланта, США

5 – Адрес для корреспонденции: konstantin_kulichikhin@yahoo.com

Метод циклической амплификации агрегатов амилоидогенного белка, известный в англоязычной литературе как Protein Misfolding Cycling Amplification (PMCA) – передовой методический подход для воспроизведения *in vitro* агрегатов прионовых и других амилоидогенных белков, сформированных *in vivo*. Этот подход может быть использован для обнаружения прионов и других амилоидов в биологических образцах, хотя успешное применение PMCA требует тщательной отработки экспериментального протокола для каждого нового белка. Мы разработали протокол для циклической амплификации прионовых агрегатов дрожжевого белка Sup35NM (укороченная форма дрожжевого приона Sup35) лизатами клеток дрожжей, содержащих [PSI⁺] – прионную форму белка Sup35. Мы сравнили эффективность агрегации при инкубации реакционных смесей в различных условиях: без встряхивания, когда спонтанной агрегации мономерной формы Sup35NM не происходит, а также со встряхиванием, где спонтанная агрегация имела место. Наши данные свидетельствуют о том, что продолжительность лаг-периода агрегации мономерного Sup35NM находится в обратной зависимости от количества добавленных «затравок», что позволяет определять наличие прионной формы Sup35 в дрожжевых лизатах методом PMCA. Главной проблемой при постановке экспериментов PMCA явилась высокая протеолитическая активность дрожжевых лизатов по отношению к мономерному белку Sup35NM. Обсуждаются различные подходы для нивелирования влияния протеолитической активности. В заключение, мы применили метод циклической амплификации для детекции в дрожжевых клетках амилоидных агрегатов, образованных химерным белком, содержащим пептид амилоид-бета (Абета) человека - фактор развития болезни Альцгеймера. Разработанный нами методические подходы могут быть применены для разработки оптимизации протокола на основе PMCA для определения агрегатов Абета в биологических образцах.

Работа выполнена на средства гранта Российского Научного Фонда 14-50-00069 с использованием оборудования ресурсных центров «Развитие Молекулярных и Клеточных Технологий» и «Биобанк» Технопарка СПбГУ.



Особенности поведения DAT-KO крыс в пространстве

Курзина Н.П.², Вольнова А.Б.^{1,2}, Гайнетдинов Р.Р.²

1 – Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет

2 – Санкт-Петербургский государственный университет, Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербург, Россия.

В настоящее время существуют различные подходы для моделирования когнитивных нарушений у человека. Была создана линия крыс, нокаутных по гену, кодирующему переносчик обратного захвата дофамина (DAT-KO крысы), моделирующая СДВГ (синдрома гиперактивности и нарушения процессов внимания). Такие животные имеют повышенный уровень дофамина и соответствующие этому нарушения поведения (Adinolfi et al., 2018). Нами было показано, что DAT-KO крысы способны различать объемные объекты при выполнении инструментальной двигательной реакции в задаче пространственного выбора (методика Gilbert, Kesner, 2003, Курзина и др., 2018). Однако длительность периода обучения у крыс DAT-KO была достоверно больше, чем у контрольных животных. В настоящем исследовании проведено изучение поведенческих реакций DAT-KO крыс при изменении пространственной организации среды. Для этой цели был использован лабиринт Хебба – Вильямса, позволяющий менять схему внутрилабиринтного пространства (Pritchett, Mulder, 2004).

Эксперименты были проведены на 5 крысах DAT-KO и 10 контрольных животных линии Wistar. Крыс помещали в стартовую камеру, в противоположном конце лабиринта был расположен финишный отсек с пищевым подкреплением. Каждое животное совершало по три побежки в каждый опытный день. В течение трех дней сохранялась одинаковая схема конфигурации внутренних стенок лабиринта, на третий же день после двухчасового временного интервала животных помещали в модифицированный лабиринт.

Было выявлено, что на третий опытный день у контрольных животных уменьшалось время побегов к финишному отсеку, а введение изменений окружающей среды приводило к незначительному уменьшению этого показателя. У крыс DAT-KO к третьему экспериментальному дню время достижения финиша наоборот возрастало, а использование модифицированного лабиринта приводило к увеличению времени побегов. Эти данные свидетельствуют о замедленном формировании у крыс DAT-KO оптимальной схемы передвижения в пространстве, тогда как контрольные животные за этот же период времени реагируют биологически адекватно, снижая время побегов за пищевым подкреплением. Повторение цикла обучения DAT-KO крыс показало, что к шестому экспериментальному дню имело место снижение времени побегов к финишу. На изменение внутренней организации лабиринта животные реагировали незначительным увеличением этого параметра, что может свидетельствовать о замедленном формировании биологически адекватных схем пространственного поведения у этих животных.

В пользу данного предположения так же свидетельствует анализ треков передвижения обеих групп крыс в лабиринте. Если у контрольных животных в процессе обучения в лабиринте Хебба – Вильямса в большинстве случаев формируется прямая траектория движения от стартового отсека к финишу по центральной оси лабиринта, то DAT-KO крысы совершают «пристеночные» перемещения, не выдвигаясь к центральной линии. Посещение зон «ошибок», которые не ведут к финишу, также значительно более выражено у DAT-KO крыс.



Полученные в исследовании данные являются прямым указанием на существенное влияние повышенного уровня дофамина у DAT-KO крыс на организацию пространственного поведения.

Работа поддержана грантом РФФ № 14-50-00069.



Образовательные проекты по направлению "Биоинформатика"

Лapidус А.Л.

Центр алгоритмической биотехнологии, Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Биоинформатика, наука, возникшая на стыке биологии, математики, программирования, статистики. Преподавание каждой из этих составляющих в отдельности помогает подготовить специалистов в своих областях знаний, но не приводит к появлению специалистов в области биоинформатики.

Новая наука это не только набор компетенций, но и новый образ мышления, новые подходы к проведению экспериментальных работ, к постановке задач, и методам их решения. Нехватка специалистов ощущается с каждым годом все острее и острее, т.к. биоинформатика непрерывно расширяет свои границы. Без нее уже не могут обойтись в медицине, экологии, сельском хозяйстве, криминалистике и т.д.

Образовательные курсы и программы, разрабатываемые в Центре алгоритмической биотехнологии, ставят своей целью заполнение этой брешы. Курс "Введение в биоинформатику", читаемый на специальности "Биология", и магистерская программа, которая начнет свою работу осенью 2018 года, являются примерами очного обучения небольшого числа студентов. Он-лайн же курсы дают возможность расширить горизонты и вовлечь в ряды биоинформатиков тех, кто лишен возможности поступления в столичные вузы и в первую очередь в СПбГУ.

Выступление будет посвящено не только уже созданным программам, но и планам Центра в образовательной области.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-50-00069).



Разработка дрожжевой модели для фенотипического анализа конформационных переключений белка PrP

Лашкул В. В.¹, Качкин Д. В.¹, Чернов Ю. О.^{1,2}, Рубель А. А.¹.

1 – Санкт-Петербургский государственный университет, Научная лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

2 – Технологический институт Джорджии, Атланта, США

Амилоиды – белковые агрегаты фибриллярной природы, формирующие межмолекулярные кросс-β-структуры. Повышенный интерес к изучению амилоидов связан с тем, что неправильная укладка и агрегация белков являются ключевыми событиями в патогенезе ряда неизлечимых нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорея Гентингтона, а также в патогенезе диабета второго типа. Все эти болезни называются амилоидозами. В особую группу амилоидозов выделяют инфекционные амилоидозы, или прионные заболевания, связанные с агрегацией и передачей между организмами белка PrP (от Prion Protein). Удобным модельным объектом для изучения белка PrP и амилоидов млекопитающих и анализа их взаимодействия друг с другом *in vivo* являются дрожжи *S. cerevisiae*, поскольку амилоидогенные белки формируют в дрожжах агрегаты, сходные по своим характеристикам с агрегатами, выявляемыми у млекопитающих и, в большинстве случаев, не оказывают токсического действия на дрожжевые клетки. Так как амилоидогенные белки не имеют в дрожжах собственного фенотипического проявления, для визуализации агрегации используют различные репортерные последовательности, например, YFP и CFP, позволяющие визуализировать агрегацию белков методами флуоресцентной микроскопии. Однако использование флуоресцентных белков не позволяет проводить масштабный скрининг факторов, влияющих на агрегацию белков. В нашей лаборатории разрабатывается дрожжевая модель, позволяющая по фенотипу «рост/отсутствие роста на селективных средах» оценивать амилоидогенный статус белков и проводить масштабный поиск факторов, влияющих на процессы амилоидогенеза. В качестве репортера мы используем С-терминальную последовательность дрожжевого фактора терминации трансляции - Sup35. В штаммах, маркированных нонсенс-мутацией *adel-14* и несущих делецию хромосомной копии *SUP35*, гибридный белок, включающий последовательность изучаемого амилоидогенного белка и репортерную последовательность, должен эффективно выполнять функции терминатора трансляции, что можно детектировать по отсутствию роста дрожжей на селективной среде без аденина. Агрегация амилоидогенного белка будет приводить к росту штаммов на селективной среде. В нашей лаборатории разработана дрожжевая модель для фенотипического анализа агрегации пептида Abeta42 человека. В настоящее время нами разрабатывается модель для мышиного белка PrP.

Работа выполнена при поддержке грантов РНФ № 14-50-00069 и РФФИ № 18-04-00799. Для выполнения исследований использовалась приборная база РЦ «ЦКП ХРОМАС» и «РМиКТ» научного парка СПбГУ.



Биомаркеры в психиатрии: создание персонализированного подхода в диагностике и терапии

Левченко А.Ю.¹, Гайнетдинов Р.Р.^{1,2}

1 – Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет

2 – Сколковский институт науки и технологий

Персонализированный подход в психиатрии является наиболее оправданным в сравнении с остальными медицинскими специализациями. Мозг человека – наиболее сложный орган, принципы функционирования которого до сих пор полностью не изучены. Нормальная физиология и патология мозга определяются массой факторов, в основе генетическими и эпигенетическими, но при этом находящимися на уровне нейронных сетей, иммунной и эндокринной систем, а также стадий онтогенеза. Результатом такой сложнейшей системы является уникальный сценарий патогенеза в случае каждого отдельного пациента с психическим заболеванием. Современная нозология психических заболеваний претерпевает кризис: существует масса общих признаков, в том числе молекулярных, между разными нозологическими единицами, в то время как внутри одной нозологической единицы мы наблюдаем существенную гетерогенность. Таким образом, современная классификация психических заболеваний является одновременно слишком узкой и слишком широкой. Персонализированный подход в психиатрии может разрешить данную проблематику. Матричная система Research Domain Criteria, разрабатываемая в стенах National Institute of Mental Health, – один из примеров такого подхода. В этой системе каждый пациент характеризуется с помощью многомерной матрицы, состоящей из элементов психической деятельности человека (внимание, тревожность, различные аспекты коммуникации и т.д.), которые характеризуются батареями тестов (от нейропсихологических до молекулярных). Персонализированный подход подразумевает использование биомаркеров: конкретных проявлений в клинической картине, которые могут быть однозначно измерены с помощью теста. Существует значительный объём современной научной литературы, который описывает потенциальные биомаркеры в психиатрии. Несмотря на то, что в клинической практике эти биомаркеры ещё не готовы к применению (за исключением нескольких фармакогенетических биомаркеров), существует множество потенциальных кандидатов. Среди них имеются биомаркеры, измеряемые с применением различных методов нейровизуализации, а также нейрофизиологические, нейропсихологические, иммунные, эндокринные, генетические, фармакогенетические и эпигенетические биомаркеры. Целью персонализированной психиатрии является интеграция различных категорий информативных биомаркеров в многомерный индивидуальный профиль каждого пациента. Данная задача может быть осуществлена с помощью алгоритмов машинного обучения, которые должны будут симулировать процессы на уровне клеток и нейронных сетей, с целью точной диагностики и рекомендации терапии. Ещё одним необходимым направлением развития технологий является установление списка информативных биомаркеров: для этой цели, изучение индивидуальных потенциальных биомаркеров необходимо проводить с использованием мультиплексных функциональных исследований.



Модель убаин-индуцированной гиперактивности у мышей C57Bl/6

Лопачев А.В.^{1,2}, Вольнова А.Б.³, Ефимова Е.В.², Евдокименко А.Н.¹, Ускова Д.Д.¹, Филимонов И.С.⁴, Птуха М.А.³, Лопачева О.М.^{1,5}, Куличенкова К.Н.¹, Аккуратов Е.Е.⁶, Федорова Т.Н.¹, Гайнетдинов Р.Р.²

1 – Научный центр неврологии, Москва, Россия;

2 – Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

3 – Биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

4 – Всероссийский Научно-Исследовательский Институт Оптико-Физических Измерений, Москва, Россия;

5 – Международный учебно-научный биотехнологический центр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

6 – Отдел прикладной физики, Королевский технический институт, Стокгольм, Швеция

Кардиотонические стероиды (КТС), ингибиторы Na,K-АТФазы, могут влиять на работу центральной нервной системы (ЦНС). Так, употребление дигоксина пациентами с сердечной недостаточностью вызывает депрессивные расстройства. Известно, что в ЦНС присутствуют эндогенные КТС, однако на данный момент их функция не достаточно изучена. Предполагается, что КТС являются гормоноподобными веществами, действующими посредством ингибирования Na,K-АТФазы, каталитическая α субъединица которой в мозге представлена тремя изоформами: $\alpha 1$, $\alpha 3$ в нейронах, $\alpha 2$ в глиальных клетках. Интрацеребровентрикулярное (icv) введение убаина крысам приводит к их гиперактивности. Но на данный момент не понятно, через какую из изоформ Na,K-АТФазы КТС реализуют свои физиологические эффекты, какие биохимические процессы опосредуют их и через какие структуры ЦНС они реализуются. Для дальнейшего изучения механизмов действия КТС необходимы исследования на линиях нокаутных мышей. При этом модель убаин-индуцированной гиперактивности у мышей ранее не была разработана.

Целью представленной работы стала постановка модели убаин-индуцированной гиперактивности у мышей с отработкой дозы убаина, оценкой двигательной активности животных, наличия нейротоксичности убаина в мозге и степени ингибирования разных изоформ α субъединицы Na,K-АТФазы.

Была разработана процедура icv введения убаина в мозг мышей линии C57Bl. Через 2 суток после постановки канюль контрольным животным вводили искусственную цереброспинальную жидкость по 1 μ л в латеральные желудочки, экспериментальным – убаин в концентрациях от 50 μ М до 500 μ М при тех же условиях. Введение 100 μ М убаина приводило к увеличению пройденного расстояния в открытом поле в 1,5 относительно контрольной группы ($p < 0,05$, $n > 8$). Также для данной группы мышей в тесте были характерны стереотипические передвижения вдоль стенок открытого поля. Введение больших доз убаина (200 μ М, 500 μ М) напротив уменьшало двигательную активность мышей, в случае 500 μ М вызывало судороги. Морфологический анализ мозга мышей через 3 суток после введения 100 μ М убаина показал отсутствие нейротоксического эффекта в стриатуме и моторной коре. Построение кривых ингибирования Na,K-АТФазы микросомальной фракции мозга и почек мыши позволило рассчитать, насколько могли быть заингибированы $\alpha 1$ и $\alpha 3$ изоформы Na,K-АТФазы в окружающей желудочки мозга ткани.



IC50 для $\alpha 1$ составила 200 μM убаина, а для $\alpha 3$ – 1,7 μM . То есть вследствие разведения при распределении по ткани, действующая концентрация убаина могла привести к незначительному ингибированию $\alpha 1$ субъединицы Na,K-АТРазы и существенному – $\alpha 3$ субъединицы Na,K-АТРазы.

Таким образом, мы разработали модель убаин-индуцированной гиперактивности у мышей и выяснили, что действующая концентрация убаина не вызывает гибели нейронов в стриатуме и моторной коре, а также предположили, что выявленные эффекты связаны с ингибированием именно $\alpha 3$ субъединицы Na,K-АТРазы.

Работа поддержана грантами РФФИ № 18-34-01002 и № 18-04-01321.



Изучение основ межвидового барьера для передачи приона [PSI^+]

Майтова А.В.¹, Гризель А.В.¹, Рубель А.А.¹, Чернов Ю.О.^{1,2}

1 – Научная лаборатория биологии амилоидов и Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

2 – Факультет биологических наук, Технологический институт Джорджии, Атланта, США.

Причиной целого ряда заболеваний млекопитающих является неправильная укладка и агрегация белка, который в норме находится в растворенном состоянии. Такие заболевания объединяют термином «амилоидозы». Прионы – инфекционные амилоиды, которые представляют собой фибриллярные белковые агрегаты с кросс- β -структурами. Все прионные заболевания на настоящий момент неизлечимы и смертельны.

Прионные инфекции передаются, в основном, между особями одного вида, однако в ряде случаев происходит заражение других видов – межвидовой прионный барьер нарушается. Несмотря на важность изучения прионного барьера, механизмы возникновения и молекулярная основа межвидовой передачи приона до сих пор слабо изучены. Одной из предполагаемых причин является дивергенция аминокислотных последовательностей взаимодействующих белков, нарушающая передачу приона.

Удобным объектом для изучения межвидового барьера являются дрожжи, у которых прионная форма белка Sup35 ($[PSI^+]$) связана с проявлением цитоплазматически наследуемых признаков. У дрожжей в силу различной степени родства видов аминокислотные последовательности белка Sup35 обладают разной степенью идентичности. Для агрегации Sup35 в клетке необходимо наличие предсуществующего приона – фактора PIN (от « $[PSI^+]$ inducibility»). Фактор PIN инициирует процесс возникновения приона $[PSI^+]$, предположительно являясь гетерологичной матрицей для образования первых агрегатов $[PSI^+]$. В роли фактора PIN обычно выступает прионная форма белка Rnq1 – $[RNQ^+]$, или другие прионные белки, например, белок Lsb2 в прионной форме $[LSB^+]$. Не выяснено, влияет ли тип фактора PIN на прионный барьер.

Данная работа направлена на исследование влияния степени идентичности взаимодействующих прион-образующих белков и типа фактора PIN, на величину межвидового прионного барьера. Прояснение основ прионизации белков может способствовать разработке профилактических и терапевтических мер по отношению к прионным заболеваниям млекопитающих, в частности человека.

Было выяснено, что возможность межвидовой передачи прионного состояния не пропорциональна степени родства видов дрожжей. Белок Sup35NM сильно дивергировавшего вида *O. methanolica* передает прионное состояние на белок Sup35 *S. cerevisiae*, но Sup35NM более близких по отношению к *S. cerevisiae* видов *Naumovozyma castellii* и *Lachancea kluyveri* не конвертирует белок Sup35 *S. cerevisiae* в прионную форму.

Также обнаружено, что морфология агрегатов белков Sup35NM дрожжей разных видов в клетках *S. cerevisiae*, в присутствии $[LSB^+]$ как затравки, сходна с морфологией агрегатов в присутствии $[RNQ^+]$ и что на положение межвидового прионного барьера замена типа фактора PIN не влияет.



Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-50-00069 и Фонда «Династия». Для исследований использовалась приборная база ресурсных центров СПбГУ: «ЦКП ХРОМАС», «МиКТ» и Центра «Биобанк».



Скрининг мутаций пептида амилоида-бета, приводящих к усилению или ослаблению его способности к агрегации

Маликова О. А.¹, Зобнина А. Е.¹, Аксёнова А.Ю.¹, Рубель А. А.¹, Чернов Ю. О.²

1 – ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

2 – Georgia Institute of Technology, Atlanta, USA
oks_malik@mail.ru

Существует ряд неизлечимых в настоящее время заболеваний, возникающих в результате аномальной укладки белков, их агрегации и отложении в различных органах и тканях с последующим нарушением функции последних. Такие болезни называются амилоидозами. Заболеванием с подобным механизмом является болезнь Альцгеймера – наиболее распространённая форма деменции. Одним из факторов, приводящих к дисфункции нервных синапсов и к гибели нейронов при Болезни Альцгеймера, является патологическое накопление амилоидного пептида (A β 42), который образуется в результате разрезания трансмембранного белка APP (Amyloid Precursor Protein). Пептид A β 42 может образовывать олигомеры, которые запускают цепные реакции образования амилоидных бляшек и тау-белков, приводящих к гибели нейронов. На сегодняшний день механизмы агрегации амилоида бета и белка Тау изучены мало. Непонятна пространственная структура агрегированного амилоида бета. В этой связи очень важны данные о мутациях, которые могут ослаблять или усиливать агрегацию пептида A β *in vivo*.

Удобным модельным объектом для изучения амилоидных белков являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Это связано с относительно быстрой скоростью роста культур и образования амилоидных агрегатов в них, а также с нетоксичностью агрегирующих белков для дрожжей. Для исследования амилоидогенного потенциала белков в нашей лаборатории разработана система на основе фенотипического анализа агрегации дрожжевого белка Sup35, являющегося прионом дрожжей и выполняющего функцию фактора терминации трансляции. В штаммах с делецией хромосомной копии белка Sup35 при наличии нонсенс-мутации *ade1-14* использование химерного белка, в котором прионогенные домены белка Sup35 слиты с изучаемым белком A β 42, даёт возможность анализировать фенотипическое проявление образования амилоидных агрегатов по характеру роста дрожжей на селективной среде с отсутствием аденина.

В нашей работе была получена гибридная конструкция, в которой N-домен белка Sup35 слит с мутантной последовательностью пептида амилоид-бета (A β 42). Для ведения мутаций использовался набор для случайного мутагенеза GeneMorph II Random Mutagenesis Kit. Полученная таким образом библиотека с мутантными последовательностями A β была размножена и трансформирована в дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. С помощью дрожжевой тест-системы ведётся поиск аминокислот ослабляющих или усиливающих агрегацию пептид A β 42.

Работа поддержана грантами РФФИ № 14-50-00069 и РФФИ № 18-04-00799. Для выполнения исследований использовалась приборная база РЦ «ЦКП ХРОМАС» и «РМиКТ» научного парка СПбГУ.



Методы анализа и визуализации сегментных дупликаций в геномах млекопитающих

Михеенко А.А.¹, Pu L.², Lin Y.³, Певзнер П.А.^{1,3}

1 – Центр алгоритмической биотехнологии, Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

2 – Department of Computer Science and Engineering, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA

3 – Research School of Computer Science, Australian National University

Повторяющиеся последовательности ДНК занимают значительную часть генома млекопитающих. Сегментные дупликации являются частным примером повторных последовательностей и представляют собой длинные последовательности нуклеотидов, которые находятся в геноме в небольшом количестве высокоидентичных копий. Сегментные дупликации играют ключевую роль в эволюции генов, в том числе в процессе эволюции приматов (Bailey *et al.*, 2004). В то же время, истинная доля сегментных дупликаций в геномах всё ещё остается неизвестной. Сегментные дупликации значительно усложняют сборку генома и существующие алгоритмы сборки зачастую допускают ошибки в данных регионах. Помимо этого, даже в геномах таких хорошо изученных модельных организмов, как человека и мыши, существующие подходы к поиску дупликаций ориентированы прежде всего на последовательности с крайне высокой степенью идентичности (выше 90%), что, с учетом неизбежного накопления мутаций в процессе эволюции, ограничивает область поиска дупликациями, возникшими не позднее 35-40 миллионов лет назад (Bailey *et al.*, 2002).

Недавно разработанный программный инструмент для поиска сегментных дупликаций SDquest (Pu *et al.*, *Genome Research*, 2018), способный находить дупликации со степенью идентичности последовательностей до 70%, показал значительное (до 20%) увеличение доли сегментных дупликаций в геноме человека по сравнению с предыдущими исследованиями. Данный инструмент также может быть использован для анализа любых геномов млекопитающих, для подавляющего большинства из которых поиск сегментных дупликаций никогда не проводился.

В то же время, большое число сегментных дупликаций в геноме (более 16 тысяч в геноме человека) представляет исключительно сложную задачу для анализа в условиях практического отсутствия подходящих инструментов визуализации. Лаборатория «Центр алгоритмических биотехнологий» в сотрудничестве с Калифорнийским университетом в Сан-Диего (США) и Австралийским Национальным Университетом разработали интерактивный геномный браузер для изучения и сравнительного анализа сегментных дупликаций. Он позволяет визуализировать сложную мозаичную структуру сегментных дупликаций, оценивать их распределение в геноме и изучать дупликации в конкретных генах.

Помимо поиска сегментных дупликаций в геномных последовательностях, значительный интерес представляет их поиск в графе сборки. Для решения данной проблемы был разработан инструмент визуализации графа сборки, который планируется интегрировать в новый инструмент сборки геномов из длинных ридов геномов Flye (Kolmogorov *et al.*, 2018). Данный визуализатор позволяет модифицировать представление графа сборки для различных целей: как для изучения структуры графа, так и для исследования кластеров повторных ребер.

Данная работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-50-00069).



Исследование методов нейропротезирования при поражении спинного мозга

Мусяенко П.Е.^{1,2,3}.

1 – Лаборатория нейропротезов, Институт трансляционной биомедицины СПбГУ;

2 – Лаборатория физиологии движений, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН;

3 – Лаборатория нейромоделирования, Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова МЗ РФ.

Поражения спинного мозга разного генеза, сопровождающиеся параличами и тяжелыми висцеральными расстройствами, представляют собой комплексную медико-социальную проблему. Актуальным является разработка эффективных лечебных подходов, что требует изучения нейронных сетей на экспериментальных моделях, выявления механизмов их работы в норме и патологии, создания технологий восстановления. В ходе исследований методов нейропротезирования выявлены структурные и функциональные особенности нейронных сетей спинного мозга. Внутриспинальная мультиклеточная регистрация позволила проанализировать активность нейронов в разных участках серого вещества поясничного утолщения. Картирование спинного мозга выявило нейрональные популяции, отвечающие за генерацию локомоторной активности при движении в разных направлениях. Иммуногистохимическими методами выполнено детальное исследование распределения в сером веществе спинного мозга нейронов, задействованных в контроле движения и висцеральных систем. Установлено, что при ходьбе в активность вовлекаются не только локомоторные нейронные сети, но и спинальные области, отвечающие за висцеральный контроль, причем степень их вовлечения зависит от особенностей локомоторного паттерна и, в частности, от направления ходьбы. Предложены подходы для управления сенсомоторными функциями на моделях парализованных животных, в частности, алгоритм стимуляции спинного мозга электродными матрицами, который воспроизводит естественную динамику активации моторных нейронов во время передвижения. Апробирован спектр материалов для нейропротезов, включая наноуглеродные конструкции, композиты силикона с углеродными нанотрубками или металлами. Проведена оценка их механических, электрических и биологических свойств, а также созданы первые образцы нейрональных имплантов на их основе.

Работа проводилась при поддержке грантов РФФИ 17-04-01822-а, РФФИ 17-29-01034-офи_м, РФФИ 14-15-00788 и гранта президента РФ МД 1018.2017.7.



Выявление амилоидных белков в протеомах наземных растений

Нижников А.А.,^{1,2,*} Белоусов М.В.,^{1,2} Белоусова М.Е.,¹ Штарк О.Ю.,^{1,2} Васильева Е.Н.,^{1,2}
Кливер С.Ф.,^{1,2} Косолапова А.О.,^{1,2} Тихонович И.А.,^{1,2} Антонец К.С.^{1,2}

1 – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии (ФГБНУ ВНИИСХМ), 196608, Россия, Санкт-Петербург, Пушкин, Подбельского ш., д.3.

2 – Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ), 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9.

*ant.nizhnikov@gmail.com

Амилоиды представляют собой белковые фибриллы, обладающие упорядоченной пространственной структурой, стабилизированной многочисленными водородными связями, что делает их одними из наиболее стабильных биогенных частиц, устойчивых к обработке детергентами и способных сохраняться во внешней среде на протяжении нескольких лет. Несмотря на то, что за длительный период изучения сформировалось устойчивое восприятие амилоидов, прежде всего, как патогенов, вызывающих десятки неизлечимых заболеваний у человека и животных, в начале XXI века эта парадигма изменилась, поскольку были найдены и амилоиды, необходимые для выполнения жизненно-важных процессов. Такие амилоиды, получившие название функциональных, были позднее обнаружены во всех трех доменах живого мира: у архей, бактерий и эукариот.

Несмотря на крайне высокую значимость для человека, растения продолжают быть одной из наиболее слабо изученных в области амилоидной биологии филогенетических групп организмов. К настоящему времени амилоидные свойства *in vivo* и при естественном уровне продукции не показаны ни для одного белка растений. Мы провели масштабный биоинформатический анализ амилоидогенных свойств белков у наземных (высших) растений. Для этого были использованы протеомы 75 видов наземных растений, содержавшие около 3 миллионов белков. В результате этой работы было установлено, что наиболее обогащенными амилоидогенными участками являются запасные белки семян растений. Так, нами было выявлено более 300 белков, содержащих домены типа бета-баррель, относящиеся к суперсемейству Cupin, и, прежде всего, 7s и 11s глобулины семян, содержащие домен Cupin-1. Значительная обогащенность амилоидогенными участками были выявлена и у ряда других семейств запасных белков семян, включая зеины, глиадины и глютенины. Экспериментальная проверка способности формировать фибриллы и детергент-устойчивые агрегаты, а также связывать амилоид-специфичные красители, показала, что некоторые запасные белки семян растений действительно обладают амилоидными свойствами. Мы предполагаем, что амилоидогенез запасных белков может играть существенную роль в обеспечении их сохранности во время естественной дегидратации, происходящей в ходе созревания семян, а также при наступлении неблагоприятных условий.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант №17-16-01100.



Реконструкция геномов представителей микробных сообществ из серий метагеномных образцов

Нурк С.Ю.¹, Горшков Ю.С.², Аксешина М.Д.³, Певзнер П.А.^{1,4}

1 – Центр алгоритмической биотехнологии, Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

2 – Лаборатория «Компьютерные технологии», университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

3 – Санкт-Петербургский Академический Университет

4 – Department of Computer Science and Engineering, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA

Множество современных метагеномных исследований включают анализ данных секвенирования целого набора образцов схожей природы, что значительно расширяет возможности для реконструкции отдельных представителей микробного сообщества. Так, использование информации об *изменениях относительного покрытия* геномных фрагментов по всем имеющимся образцам, позволило значительно усовершенствовать методы *биннинга* — разделения геномных фрагментов на группы, принадлежащие отдельным организмам.

К сожалению, распространенные в данный момент методики обладают серьезными недостатками и ограничениями, заставляя ведущие группы дополнять их запутанными и трудоемкими процедурами уточнения. Так, большинство исследований осуществляется с использованием совместной *de novo* сборки всех имеющихся образцов. К сожалению, такой подход обладает рядом существенных недостатков. К примеру, совместная сборка зачастую оказывается вычислительно трудной или вовсе неосуществимой, а проблема фрагментации сборки из-за присутствия в данных близкородственных бактериальных штаммов значительно усугубляется с увеличением количества образцов.

С начала 2016 года в лаборатории «Центр алгоритмических биотехнологий» в сотрудничестве с Калифорнийским университетом в Сан-Диего (США) ведется разработка нового вычислительного протокола MTS (Metagenomic Time Series) для осуществления качественной реконструкции отдельных представителей микробного сообщества по данным метагеномных серий.

MTS интегрирует ранее разработанный в нашей лаборатории метагеномный сборщик metaSPAdes (Nurk et al., *Genome Research*, 2017), современные инструменты для осуществления биннинга, а также автоматизированный анализ графов сборки с целью повышения точности результата. MTS не требует совместной сборки всех имеющихся данных, а также включает анализ внутривидового разнообразия по частотам однонуклеотидных вариаций, что в некоторых случаях позволяет восстановить геномы сразу нескольких близкородственных штаммов для одного микроорганизма.

В данный момент идет подготовка статьи, посвященной подробному описанию протокола, а также результатам его сравнительного тестирования на различных наборах синтетических и реальных данных.

Данная работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-50-00069).



Сравнительная оценка стабильности ферментативной активности полисиалированной дезоксирибонуклеазы I (ПСК-ДНКазы) и препарата Пульмозим.

Онохин К.В.^{1,2}

1 – ПАО «Фармсинтез», Санкт-Петербург, Россия

2 – Институт Трансляционной биомедицины, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Муковисцидоз – генетическое заболевание, обусловленное мутацией в гене трансмембранного регулятора проводимости хлорного канала (CFTR). Заболевание характеризуется тяжелым течением и неблагоприятным прогнозом вследствие поражения экзокринных желез. В отсутствие функционального CFTR ионы натрия и вода гиперabsorbруются, что ведет к снижению количества жидкости на поверхности дыхательных путей. Обезвоживание приводит к образованию гипервязкого слизистого слоя, вследствие чего ухудшается естественный мукоцилиарный клиренс (МСС), развивается устойчивая инфекция дыхательных путей бактериальными и вирусными патогенами. В ходе воспалительного ответа нейтрофилы становятся источником большого количества внеклеточной ДНК в мукоальвеолярных секретах пациентов.

Современным стандартом симптоматического лечения муковисцидоза является препарат Пульмозим (Ф. Хоффманн-Ля Рош, Швейцария). Однако, «Пульмозим» обладает рядом недостатков: необходимость частых ингаляций и довольно высокая стоимость. Таким образом, поиск более доступных и эффективных терапевтических агентов остается актуальной задачей. ПАО «Фармсинтез» был получен конъюгат полисиаловой кислоты и человеческой рекомбинантной ДНКазы I (дорназы альфа) с длиной сиалового остатка 14,7кДа (ПСК-ДНКазы).

Цель исследования: оценка сохранения ферментативной активности потенциального лекарственного агента для симптоматического лечения муковисцидоза – гликомодифицированной (полисиалированной) рекомбинантной дезоксирибонуклеазы I человека в сравнении с Пульмозимом (Ф. Хоффманн-Ля Рош, Швейцария).

Клинические образцы мокроты были получены от добровольцев с диагностированным муковисцидозом в клинике Университета Северной Каролины. Ферментативную (гидролитическую) активность ПСК-ДНКазы и препарата сравнения в концентрации 0,6 и 3 мкг/мл оценивали при помощи метода горизонтального электрофореза и кинетического метода с использованием коммерческого набора Quant-iTtm PicoGreentm dsDNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific, США).

Было показано, что энзиматическая активность ПСК-ДНКазы и немодифицированной дорназы альфа в фосфатно-солевом растворе в течение 3 и 6 часов (37°C) достоверно не различалась, что указывает на отсутствие воздействия полисиаловой кислоты на ферментативную активность ДНКазы I в составе конъюгата. При использовании в качестве реакционной среды мукоальвеолярного секрета пациентов с муковисцидозом, в который добавляли модельную ДНК, было показано, что образец ПСК-ДНКазы более устойчив к протеолитическим условиям – ПСК-ДНКазы сохраняет ферментативную активность на протяжении 3-х часов в протеолитической среде.

Далее ПСК-ДНКазу и препарат сравнения инкубировали в протеолитической среде супернатанта мукоальвеолярного секрета в течение 6 часов, после чего в пробирки добавляли модельную ДНК, а спустя 30 минут оценивали уровень ферментативной активности для каждого образца. Показатели активности ПСК-ДНКазы достоверно превышали таковые для дорназы альфа.



Таким образом, конъюгат ПСК-ДНКза с молекулярной массой сиалового остатка 14,7кДа в сравнении с дорназой альфа является более устойчивым к протеолитическим условиям.



Исследование подвижных участков белка Sup35NM в мономерах и в составе фибрилл методами ЯМР с диффузионным фильтром

Подкорытов И.С.¹, Харьков Б.Б.¹, Белоусов М.В.², Бондарев С.А.², Kämpf К.¹, Журавлева Г.А.², Двинских С.В.^{1,3}, Скрынников Н.Р.^{1,4}

1 – *Laboratory of Biomolecular NMR, Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, Russia*

2 – *Department of Genetics and Biotechnology, St. Petersburg State University, Russia*

3 – *Department of Chemistry, Royal Institute of Technology KTH, Stockholm 114 28, Sweden*

4 – *Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette IN 47906, USA*

Механизмы и условия образования агрегатов прионных белков привлекают внимание исследователей в связи с их значением в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Широко распространенной модельной системой для исследования молекулярных механизмов прионных инфекций служит белок Sup35p, входящий в комплекс терминации трансляции в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Структурно этот белок может быть разделен на три домена – два из которых, N и M, играют ключевую роль в формировании фибрилл. Традиционно считается, что образцы фибрилл, приготовляемые для лабораторных исследований, состоят исключительно из фибрилл как таковых. Однако, как мы показываем в этой работе, на деле любой из таких образцов представляет собой сложную систему, в которой фибриллы находятся в динамическом равновесии с мономерной формой белка (и/или олигомерами низкого порядка). В нашем исследовании мы использовали как желеобразные образцы Sup35NM, так и жидкие образцы, содержащие небольшое количество (300-500 мМ) мочевины. Для изучения этих образцов использовались как методы твердотельной, так и жидкостной ЯМР спектроскопии.

В современной литературе ставится под вопрос применимость стандартных ЯМР методов для определения трансляционной диффузии в подобных системах. Нам удалось создать математически строгую модель для подобных экспериментов, которая доказывает их полную применимость для такого рода образцов. Аналогичным образом нами была показана применимость импульсных последовательностей с использованием т.н. диффузионных фильтров. С помощью такой импульсной последовательности нам удалось разделить спектральные сигналы от подвижных хвостов фибрилл и мономерной формы Sup35NM. Тщательный анализ получаемых экспериментальных данных показал, что речь идет именно о мономерах, а не об олигомерах низкого порядка. Более того, нам удалось установить, что N-домен Sup35NM в мономерной форме представляет собой неоднородную расплавленную глобулу. Этот ранее неизвестный результат представляется легко объяснимым, учитывая склонность N-домена к образованию фибрилл.

С другой стороны M-домен обладает высокой подвижностью как в составе фибрилл, где он играет роль гибкого хвоста, так и в мономерной форме Sup35NM. Используя специально приготовленные образцы Sup35M, а также Sup35NM, селективно обогащенного изотопом ¹⁵N в остатках валина, нам удалось уточнить границы этого подвижного участка.

Настоящая работа поддержана грантом РФФИ 15-14-20038.



Получение рекомбинантного белка E2 вируса гепатита С и изучение его взаимодействия с человеческим CD81

Поляков Д.С.^{1,2}, Грудинина Н.А.², Синицына Е.^{1,3}, Коржиков-Влах В.А.¹, Шавловский М.М.², Тенникова Т.Б.¹

1 – *Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

2 – *Институт экспериментальной медицины, Российская академия наук, Санкт-Петербург, Россия*

3 – *Институт высокомолекулярных соединений, Российская академия наук, Санкт-Петербург, Россия*

Вирус гепатита С (HCV) проникает в гепатоциты человека, используя мембранный рецептор CD81. Рекомбинантные аналоги этого рецептора могут служить в качестве соединения, антигенно неспецифично связывающего вирусные частицы. Использование для этой цели анти-HCV антител мало эффективно, так как HCV обладает высокой изменчивостью, что позволяет ему постоянно «ускользать» от иммунного ответа. Нами получено 2 варианта рекомбинантного белка CD81. Осуществлена ковалентная модификация большой экстраклеточной петлей CD81 нано- и микрочастиц на основе поли(молочной кислоты) (ПМК). Введенные в организм микрочастицы, содержащие CD81, могут эффективно связывать вирус в плазме крови с последующим его разрушением макрофагами, устраняя вирусемию. Макрофагальный захват частиц ПМК-CD81 с сорбированными вирусными частицами предполагает эффективный иммунный ответ на любой вариант вируса. Кроме того, созданные частицы ПМК-CD81 могут быть использованы для улучшения диагностики вирусемии при вирусном гепатите С. Предполагается, что можно увеличить чувствительность обратной транскрипции (с последующей вирус-специфичной ПЦР) за счет увеличения числа вирионов в объеме пробы вследствие связывания вирионов с частицами ПМК-CD81 и последующим их осаждением. Таким образом, по сравнению с исходным образцом плазмы крови больного значительно большее количество вирионов становится доступным для реакции обратной транскрипции.

Растворимый, неинфекционный и дешевый модельный белок E2 HCV нужен для тестирования получаемых частиц ПМК-CD81. Для этого нами было создано 2 плазмиды для гиперэкспрессии полноразмерного E2 и фрагмента E2 (412-645 а.к.о.) в культуре человеческих клеток. Вторая конструкция позволила выделить растворимый целевой белок, но его препаративное получение оказалось очень дорогим. Для удешевления синтеза и очистки рекомбинантного растворимого E2 было создано еще 4 плазмиды для синтеза в клетках *E.coli*. Оказалось, что для трех из использованных плазмид получаемый целевой белок легко агрегировал, а его ренатурация после растворения в детергентах в большинстве случаев не представлялась возможной. Отчасти это объясняется фибрилlogenностью получаемых E2 (обнаружена нами впервые). Тем не менее, одна из плазмид позволила синтезировать растворимый химерный белок, состоящий, в том числе, из E2 HCV, и аффинно выделить его из *E.coli* (3-10 мг из литра культуры). Полученный белок оказался достаточно стабильным: более 95% оставалось растворимым при хранении в течение месяца в PBS. Очищенный E2 эффективно связывался с CD81.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-50-00069, направление 05-109).



Влияние размера и состава микрочастиц на иммуногенность связанного с ними белка

Поляков Д.С.^{1,2}, Сахабеев Р.Г.², Синицына Е.С.^{1,3}, Коржикова-Влах Е.Г.^{1,3}, Коржиков-Влах В.А.¹, Шавловский М.М.², Тенникова Т.Б.¹

1 – Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

2 – Институт экспериментальной медицины, Российская академия наук, Санкт-Петербург, Россия

3 – Институт высокомолекулярных соединений, Российская академия наук, Санкт-Петербург, Россия

Данная работа является частью проекта по созданию «ловушек» вирусных частиц, в частности, для терапии гепатита С. Осуществлена ковалентная иммобилизация на поверхности различных нано- и микрочастиц рекомбинантного CD81 – рецептора, с которым связывается белок E2 вируса гепатита С при проникновении в гепатоцит человека. Предполагается, что полученные конъюгаты белок-частица будут способны к специфическому связыванию с вирионами, с последующим поглощением клетками иммунной системы организма. Значительный интерес с точки зрения иммунологии представляет выяснение влияния различных микрочастиц на иммуногенность связанного с ними белка. Представлены результаты экспериментов, направленных на изучение влияния конъюгирования белка с полимерными частицами, на его иммуногенность. Для этого была использована модельная система, включающая 3 типа микрочастиц и белок слияния β 2M-GFP в качестве антигена:

- 1) частицы на основе поли(молочной кислоты) (ПМК) с диаметром 1.4-2.0 мкм, ковалентно модифицированные белком β 2M-GFP
- 2) смесь частиц ПМК с диаметром 1.4-2.0 мкм и β 2M-GFP – контроль 1
- 3) частицы ПМК с диаметром 100 нм, ковалентно модифицированные белком β 2M-GFP
- 4) смесь частиц ПМК с диаметром 100 нм и β 2M-GFP – контроль 2
- 5) частицы на основе сополимера глутаминовой кислоты и фенилаланина с диаметром 200 нм, ковалентно модифицированные белком β 2M-GFP

Для изучения влияния исследуемого антигена на иммунный ответ мышам внутрибрюшинно вводили указанные препараты. Адьюванты и другие вещества, повышающие иммуногенность, не использовали. Каждой группе мышей (30-40 мышей в группе, 5 групп) было проведено 4 иммунизации с интервалами по 14 дней. Забор крови у мышей осуществляли из щечной вены через 13 дней после каждой иммунизации. Каждой мышке в опытных группах за одну иммунизацию вводились нано- или микрочастицы, ковалентно модифицированные 1 мкг антигена. Мышам в контрольных группах вводилась смесь с 1 мкг антигена не связанных с нано- или микрочастицами.

Титр антител против модельного белка в сыворотках мышей определяли методом ИФА. Обнаружены достоверные различия ($p < 0,001$) между уровнем антител к модельному антигену в контрольных группах и во всех опытных группах. Связывание антигена с тремя типами изученных микрочастиц достоверно снижает гуморальный иммунный ответ у экспериментальных животных. Ярче всего этот эффект виден при сравнении контрольных групп с группой 1. Достоверной разницы в титре специфических антител между контрольными группами не выявлено.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-50-00069, направление 05-109).



Биоконъюгация пептидов в контексте таргетной терапии: моделирование и эксперимент

Rogacheva O.N.^{1,2}, Luzik D.A.¹, Izmailov S.A.¹, Indeykina M.A.³, Skrynnikov N.R.^{1,4}

1 – *Laboratory of Biomolecular NMR, Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, 199034*

2 – *Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg 199034*

3 – *Emanuel Institute for Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow 119334*

4 – *Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette IN 47906, USA*

Ковалентные ингибиторы белков-мишеней и созданные на их основе лекарственные препараты широко применяются в медицинской практике (аспирин, антибиотики пенициллинового и цефалоспоринового рядов, омепразол). В то же время дальнейшему распространению ковалентных лекарств препятствует их низкая специфичность, приводящая к высокой токсичности. Очевидным способом минимизации подобных побочных эффектов является уменьшение реакционной способности группы, участвующей в образовании ковалентной связи, и одновременное усиление специфичности нековалентного связывания за счет введения дополнительных функциональных групп. Естественным подходом для реализации этой стратегии является использование ковалентных пептидных лигандов либо соответствующих пептидомиметиков.

Мы задались целью разработать алгоритм на основе метода Молекулярной Динамики, позволяющий моделировать образование ковалентных комплексов между специальным образом модифицированными пептидами и их белковыми мишенями. В качестве тестовой системы был избран комплекс N-терминального SH3 домена адаптерного белка Grb2 и пептидный лиганд имитирующий последовательность белка Sos1 с включенным в его состав ненативным остатком (хлорацетил лизин). Экспериментальное исследование этого комплекса подтвердило, что ковалентное связывание пептида с мишенью носит медленный характер и протекает с образованием тиоэфирной связи с расположенным поблизости остатком цистеина. Более того, нам удалось продемонстрировать, что реакционноспособной формой цистеина в этом случае является тиолят-анион. Используя полученную информацию, мы разработали специализированный протокол МД для моделирования ковалентного связывания в данной системе. В качестве первого шага мы использовали методы квантовой химии с тем, чтобы рассчитать параметры силового поля необходимые для моделирования хлорацетил лизина и получаемой в ходе реакции тиоэфирной связи. В качестве следующего шага мы разработали специальный эмпирический протокол, позволяющий воспроизвести процесс разрыва и образования химических связей в процессе МД моделирования. Таким путём на основе известной структуры нековалентного комплекса Grb2 N-SH3 / Sos1 нам удалось создать высококачественную модель соответствующего ковалентного комплекса. Для валидации полученной таким образом МД модели мы провели расчёт химических сдвигов при помощи программы SHIFTX2. Полученные результаты находятся в хорошем согласии с экспериментально измеренными в нашей работе химическими сдвигами. В дальнейшем мы предполагаем использовать разработанную нами стратегию для таких терапевтически важных мишеней, как RANK/RANKL (система, регулирующая резорбцию кости), TGF β , и др. Работа поддержана грантом РФФИ 15-14-20038.



Новые функциональные амилоиды дрожжей и мозга млекопитающих: свойства и особенности

Сергеева А.В.¹, Задорский С.П.^{1,2}, Рыжова Т.А.^{1,2}, Сопова Ю.В.^{1,2}, Качкин Д.В.³, Велижанина М.Е.¹, Галкин А.П.^{1,2}.

1 – Санкт-Петербургский Государственный Университет, кафедра Генетики и биотехнологии.

2 – Санкт-Петербургский филиал Института Общей Генетики РАН,

3 - Санкт-Петербургский Государственный Университет, научная лаборатория Биологии амилоидов.

Амилоиды – неветвящиеся белковые фибриллы, в которых β -складчатые листы расположены перпендикулярно продольной оси фибриллы. Ранее с помощью разработанного в нашей лаборатории метода протеомного скрининга PSIA-LC-MALDI были обнаружены новые потенциальные функциональные амилоиды дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (белок Toh1) и мозга крысы *Rattus norvegicus* (белок FXR1).

FXR1 – ядерно-цитоплазматический РНК-связывающий белок, участвующий в контроле памяти и психоэмоционального состояния. Ранее мы показали, что данный белок в норме присутствует в мозге крысы в виде высокомолекулярных SDS-устойчивых агрегатов, связывает амилоид-специфический краситель тиофлавин-S и колокализуется с мРНК в пирамидальных нейронах гиппокампа, защищая ее от деградации РНКазами. Способность амилоидных конформеров N-концевого домена FXR1 специфически связывать мРНК была подтверждена нами *in vitro*. В системе *in vitro* мы показали, что связывание РНК ускоряет процесс перехода N-концевого домена FXR1 в амилоидную конформацию, что хорошо согласуется с последними данными об агрегации РНК-связывающих белков с прионоподобными доменами. В качестве модельной системы для изучения амилоидных свойств FXR1 в мозге человека мы использовали культуру клеток нейробластомы человека IMR32. Мы показали, что, как и в мозге крысы, в клетках нейробластомы FXR1 детектируется преимущественно во фракциях олигомеров и высокомолекулярных агрегатов. Более того, соотношение мономерной, олигомерной и высокомолекулярной фракций FXR1 в клетках IMR32 зависит от наличия сыворотки в среде. Голодание по сыворотке, являющееся сигналом для дифференциации клеток, приводит к резкому увеличению синтеза FXR1 и образованию высокомолекулярных белковых агрегатов, а избыток сыворотки в среде приводит к крайне низкому уровню синтеза белка, который образует олигомеры.

Белок клеточной стенки дрожжей Toh1 был ранее выявлен методом PSIA-LC-MALDI в нескольких штаммах *S.cerevisiae* разного происхождения и прионного статуса. Мы показали, что гибридный белок Toh1-YFP образует SDS-устойчивые агрегаты в клетках дрожжей. Амилоидогенный регион Toh1 (1 - 163 ак.) в бактериальной системе C-DAG образует белковые фибриллы, связывающие амилоид-специфичный краситель Конго Красный и демонстрирующие яблочно-зеленое свечение за счет двойного лучепреломления при поляризационной микроскопии. Более того, эффективность агрегации Toh1-YFP зависит от присутствия в клетке дрожжевых прионов [PSI+] и [PIN+]. Toh1-YFP с высокой частотой колокализуется с флуоресцентными агрегатами Sup35NM-CFP и Rnq1-CFP. Таким образом, амилоидоподобная агрегация белка Toh1, не являющегося Q/N-богатым, зависит от его взаимодействия с Q/N-богатыми прионными белками.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-50-00069, РФФИ и ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС» и «РМиКТ» научного парка СПбГУ.



Создание наноловушек для вируса гепатита С

Синицына Е.С.^{1,2}, Поляков Д.С.^{1,3}, Грудина Н.А.³, Коржикова-Влах Е.Г.^{1,2}, Коржиков-Влах В.А.¹, Тенникова Т.Б.¹

1 – Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

2 – Институт высокомолекулярных соединений российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

3 – Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Гепатит С – воспалительное заболевание печени, которое может протекать бессимптомно в течение длительного времени, что делает его особенно опасным, так как последствия данной болезни связаны с высоким риском развития цирроза и рака печени. В связи с этим своевременное выявление заболевания и проведение терапии на ранних стадиях представляет собой одну из актуальных задач современной медицины. Известно, что вирус гепатита С проникает в клетки после взаимодействия белка E2, расположенного на его поверхности, с рецептором CD81, находящемся на поверхности клеток. В данной работе было предложено получение ловушек вируса гепатита С на основе полимерных частиц, способных связывать данный вирус, и, тем самым, блокировать его. Для решения данной задачи было предложено использовать полимерные биodeградируемые частицы, поверхность которых модифицирована фрагментом белка CD81, а именно, LEL-CD81. Поскольку работа с вирусами требует повышенных условий безопасности на первоначальном этапе работы исследования проводились с использованием физико-химических моделей вируса гепатита С. Данные модели были получены путем модификации полимерных наночастиц, с размером близким к размерам вирионов гепатита С (50-60 нм), белком E2 (антигенная детерминанта вируса гепатита С).

Для создания ловушек вируса гепатита С методом одинарной эмульсии получали частицы на основе поли(молочной кислоты). Данный полимер был выбран поскольку он является нетоксичным, биосовместимым и одобрен для применения в медицине. На поверхности сформированных частиц за счет реакции активированных карбоксильных групп полимера и аминок групп белка проводили ковалентную иммобилизацию рекомбинантного LEL-CD81. В качестве контроля использовали частицы, несущие на своей поверхности модельный белок, не имеющий сродства к E2, а именно, соевый ингибитор трипсина. Иммобилизационная емкость составляла 3 и 2 мкг белка/мг полимерных частиц, соответственно. Для конструирования модели вируса гепатита С получали наночастицы на основе блок-сополимера полиэтиленгликоля (ПЭГ-5000) с поли(молочной кислотой) методом наноосаждения. Поверхность данных частиц модифицировали рекомбинантным белком E2, меченным флуоресцентной меткой. Иммобилизационная емкость в данном случае составляла 15 мкг белка/мг полимерных частиц. Средний размер частиц, индекс полидисперсности, а также величину дзета-потенциала для полученных объектов оценивали методом динамического рассеивания света. Конфокальную флуоресцентную микроскопию использовали для детектирования специфического взаимодействия между разработанными ловушками и моделью вируса гепатита С.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-50-00069, направление 05-109).



Идентификация функциональных амилоидов в оогенезе

Синюкова В.А.¹, Рыжкова К.В.², Сопова Ю.В.^{1,2}, Рыжова Т.А.¹, Галкина С.А.², Кошель Е.В.², Галкин А.П.^{1,2}

1 – Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова, РАН

2 – Санкт-Петербургский государственный университет

Амилоиды представляют собой фибриллярные белковые агрегаты, которые формируются за счет образования упорядоченных межмолекулярных бета-складчатых слоёв. Традиционно в литературе рассматриваются преимущественно патологические амилоиды, ассоциированные с десятками неизлечимых заболеваний человека. Однако со временем были выявлены амилоиды, в норме присутствующие в клетках широкого спектра живых организмов и выполняющие жизненно важные функции, от образования биопленки бактерий и до участия в синтезе меланина у млекопитающих и человека. В последние годы появляется все больше данных о том, что в норме в ооцитах и в оогенезе в целом у самых различных организмов присутствуют функциональные амилоиды, однако природа их остается неизученной. В нашей лаборатории был разработан универсальный метод протеомного скрининга амилоидов (PSIA-LC-MALDI), основанный на устойчивости амилоидных фибрилл к ионным детергентам и позволяющий выявить белки, формирующие SDS-устойчивые агрегаты в исследуемом образце. С помощью данного метода были проанализированы яичники *Drosophila melanogaster* и *Gallus gallus domesticus*, и были составлены предварительные списки белков-кандидатов на роль функциональных амилоидов. Для *Drosophila melanogaster* наиболее перспективными кандидатами для дальнейших исследований на данный момент являются мажорный белок хориона CH36 и нуклеопорин Nup50, выявлявшиеся во всех образцах, изученных на данный момент при помощи протеомного скрининга. Это подтверждается тем, что на срезах яичников дрозофилы хорион и частично оболочка ядра связывают амилоид-специфичный краситель тиофлавин-S; хорион также связывает Конго Красный, демонстрируя яблочно-зеленое свечение в поляризованном свете. Известно, что делеция Cr36 вызывает серьезные нарушения в структуре хориона, что, в конечном счете, препятствует оплодотворению. Также уже были показаны амилоидные свойства для некоторых нуклеопоринов дрожжей. Для *Gallus gallus domesticus* наиболее перспективным на данный момент является белок вителлогенин 2 (Vit2) – предшественник основных запасующих белков желтка, источников питательных веществ на ранних этапах развития эмбриона. На срезах яичников курицы в фолликулярных клетках видны гранулы, связывающие тиофлавин-S, содержащие, предположительно, вителлогенин. Кроме того, окрашивание срезов яичников курицы амилоид-специфичным красителем Тиофлавином S демонстрирует наличие амилоидоподобных структур в ооцитах на ранних и средних стадиях их роста. Таким образом, в результате нашей работы были идентифицированы белки-кандидаты на роль функциональных амилоидов у достаточно эволюционно отдаленных видов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-50-00069 и ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС» и «РМиКТ» научного парка СПбГУ.



Амилоиды регулируют жизненно-важные процессы у высших эукариот

Сопова Ю.В.^{1,2}, Шенфельд А.А.², Синюкова В.А.¹, Рыжкова К.В.², Задорский С.П.^{1,2},
Белашова Т.А.^{1,2}, Галкин А.П.^{1,2}

1 – Санкт-Петербургский филиал Института Общей Генетики им. Н.И. Вавилова, РАН,

2 – Санкт-Петербургский государственный университет

Амилоиды представляют собой особый тип фибриллярных структур, некоторые из которых вызывают социально значимые заболевания, тогда как другие регулируют жизненно-важные процессы у высших и низших эукариот. Идентификация каждого нового амилоида является заметным научным событием, так как до недавнего времени не существовало универсальных методов, позволяющих выявлять эти фибриллярные структуры. Мы разработали протеомный метод детекции белков, обладающих амилоидными свойствами, в любых органах и тканях различных организмов. Этот метод основан на универсальном свойстве амилоидных фибрилл – их уникальной устойчивости к обработке додецилсульфатом натрия (SDS). Амилоидные свойства каждого из выявленных в протеомном скрининге белков-кандидатов необходимо проверять индивидуально.

С помощью протеомного скрининга мы выявили ряд потенциально амилоидогенных белков в мозге молодых самцов крысы. Ранее мы показали, что белок FXR1, регулирующий память и эмоции, формирует амилоидные конформеры, которые связывают молекулы РНК и предохраняют их от деградации в нейронах коры головного мозга. В список выявленных в протеомном скрининге кандидатов входит белок MBP, играющий важную роль в организации миелиновых оболочек аксонов многих нейронов. С помощью антител мы подтвердили, что MBP представлен в мозге в виде SDS-устойчивых олигомеров и нерастворимых агрегатов. На криосрезах мозга MBP колокализуется с амилоид-специфичным красителем тиюфлавин-S. Мутации по гену MBP приводят к демиелинизации и к развитию нейродегенеративных заболеваний.

Другое направление нашей работы – выявление функциональных амилоидов в яйцниках и ооцитах различных организмов. На криосрезах яйчников дрозофилы выявляются структуры, связывающие амилоид-специфичный краситель. Сопоставление этих данных с результатами протеомного скрининга позволяет выделить в качестве наиболее реальных кандидатов на роль функциональных амилоидов нуклеопорин Nup50 и белок оболочки ооцитов CH36. Анализ ооцитов курицы позволяет обосновано предположить, что основной запасующий белок желтка вителлогенин транспортируется из печени и запасается в ооците в виде амилоидных гранул. Таким образом, амилоидные белки могут играть важную роль в оогенезе у различных организмов. Мы планируем проанализировать возможную взаимосвязь формирования амилоидных структур с широко распространённой аллергией на белки куриного яйца. Начата работа по идентификации амилоидов в оогенезе млекопитающих.

Работа выполняется при поддержке гранта РФФИ № 14-50-00069.



Биодеградируемые наноконструкции для фармакологии: создание систем доставки лекарств и блокирования патогенов

Тенникова Т.Б.

*Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет
tennikova@mail.ru*

Неотложной и крайне важной задачей современного здравоохранения является разработка абсолютно оригинальных, «умных» лекарственных форм, обеспечивающих повышенную терапевтическую активность препарата при минимуме побочных эффектов. Более того, исследования в данном направлении могут приводить к неожиданным решениям при выборе способов лечения различных заболеваний, включая широко распространенные и крайне опасные поражения организма. Биодеградируемые наноконтейнеры с контролируемыми физическими и химическими характеристиками, такими как размер и распределение размеров наночастиц, скорость деградации химических связей, определяющих структуру полимера, а также биологические (биомиметические) свойства поверхности частиц, обеспечивающие естественное вовлечение наночастиц в метаболические процессы живого организма, позволят достигнуть желаемых результатов.

Целью представляемого широкомасштабного исследования является разработка алгоритмов создания биологически функциональных наноконструкций на основе наночастиц различной химической природы. Разработаны методы функционализации поверхности наноконтейнеров не только с целью создания систем точечной доставки лекарств к специфическим биологическим мишеням, но также аналогичных по своей идее систем, обладающих свойствами блокирования патогенов различной природы.

Предлагаемые наноконструкции и цели их применения безусловно могут быть перенесены в фарминдустрию. Снижение риска побочных эффектов, обусловленное точным выбором молекулярных мишеней, а также снижение времени терапии, определяют социальную значимость полученных результатов и могут привести к значительным экономическим эффектам.

Guryanov I., Fiorucci S., Tennikova T. Receptor-ligand interactions: Advanced biomedical applications. REVIEW ARTICLE. Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications. 68 (2016) 890-903.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-50-00069, направление 05-109).



Метагеномная сборка из синтетических длинных ридов с помощью графа де Брюйна

Толстогоанов И.Н., Банкевич А.В.

*Центр алгоритмической биотехнологии, Институт трансляционной биомедицины,
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

Набирающие популярность технологии получения синтетических длинных ридов (SLR), представленные протоколами TruSeq Synthetic Long Read (Illumina) и Chromium (10X Genomics), широко применяются к анализу и сборке геномов эукариот. Однако, в настоящий момент анализ бактериальных сообществ с помощью синтетических длинных ридов затруднителен ввиду нехватки вычислительных методов. В лаборатории “Центр алгоритмической биотехнологии” был разработан программный инструмент cloudSPAdes — модуль геномного сборщика SPAdes, предназначенный для использования синтетических длинных ридов, полученных с помощью протокола Chromium. Сравнение с другими сборщиками генома, использующими данные SLR, показало, что cloudSPAdes выдает более качественные сборки на метагеномных наборах данных различной сложности.

Данная работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-50-00069).



Амилоидные свойства белка Munc18-1 крысы *Rattus norvegicus*

Чиринскайте А.В.², Синюкова В.А.¹, Сопова Ю.В.^{1,2}, Рыжова Т.А.^{1,2}, Велижанина М.Е.²,
Задорский С.П.^{1,2}, Галкин А.П.^{1,2}

1 – Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова, РАН

2 – Санкт-Петербургский государственный университет

Амилоиды представляют собой упорядоченные белковые фибриллы, в которых бета-складчатые листы формируются за счет образования межмолекулярных водородных связей. Среди их свойств выделяют устойчивость к воздействию ионных детергентов при комнатной температуре и связывание с амилоид-специфическими красителями: тиофлавинами Т и S и Конго красным. Связывание амилоида с Конго красным приводит к появлению характерного яблочно-зеленого окрашивания в поляризованном свете. Среди большого разнообразия амилоидов выделяют патологические, вызывающие тяжелые заболевания человека и животных, и функциональные, играющие важную биологическую роль. В нашей лаборатории был разработан универсальный метод протеомного скрининга амилоидов (PSIA-LC-MALDI), основанный на устойчивости амилоидных фибрилл к ионным детергентам и позволяющий выявить белки, формирующие SDS-устойчивые агрегаты в исследуемом образце. С использованием данного метода нами был проведен поиск функциональных амилоидов в мозге крысы *Rattus norvegicus*. В результате протеомного скрининга был выявлен белок Munc18-1 - цитоплазматический белок, участвующий в секреции нейромедиаторов. Ранее было показано, что некоторые мутации в данном белке у человека могут приводить к ранней младенческой эпилептической энцефалопатии (Early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst, EIEE), также известной как синдром Отахара. Биоинформатический анализ Munc18-1 с использованием алгоритма ArchCandy показал наличие трех потенциально амилоидогенных участков в С-терминальной части белка. Используя метод PAGE с последующей вестерн-блот гибридизацией, мы показали, что в мозге крысы присутствуют высокомолекулярные агрегаты белка Munc18-1. Эти агрегаты являются детергент-устойчивыми, что было показано методом SDD-AGE. Используя бактериальную систему C-DAG, мы показали образование амилоидных фибрилл фрагментами белка Munc18-1. Колонии штамма VS39 бактерий *E. coli*, выращенные на среде, содержащей Конго красный, и экскретирующие фрагменты исследуемого белка, демонстрировали яблочно-зеленую окраску при микроскопии в поляризованном свете. Трансмиссионная электронная микроскопия позволила увидеть внеклеточные фибриллы, образованные фрагментами белка Munc18-1. Эти результаты дают основания полагать, что Munc18-1 – кандидат на роль функционального амилоида в мозге крысы *Rattus norvegicus*.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-50-00069, РФФИ № 18-34-00419 мол_а и ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС» и «РМиКТ» научного парка СПбГУ.



Амилоидные конформеры белка МВР предохраняют аксоны

Шенфельд А.А.^{1,2}, Сопова Ю.В.^{1,2}, Рыжова Т.А.², Чиринскайте А.В.¹, Велижанина М.Е.¹, Галкин А.П.^{1,2}

1 – Санкт-Петербургский государственный университет.

2 – Санкт-Петербургский филиал института общей генетики им. Н.И. Вавилова, РАН.

Амилоиды представляют собой упорядоченные высокомолекулярные белковые полимеры, обогащенные бета-слоями. Накопление амилоидных фибрилл в различных тканях, как правило, ассоциировано с патологическим процессом, именуемым амилоидозом. Однако, помимо патологических, существуют т.н. функциональные амилоиды, которые опосредуют или напрямую участвуют в поддержании жизненно важных процессов. К ним, к примеру, можно отнести белок СРЕВ моллюска *Aplysia californica*, который участвует в формировании долговременной памяти, или человеческий белок Pmel17, задействованный в связывании молекул меланина. Поскольку в современной практике до недавнего времени не было универсальных биохимических методов идентификации амилоидов *in vivo*, можно предположить, что в тканях мозга млекопитающих существуют другие, пока еще не охарактеризованные амилоидные полимеры.

В нашей лаборатории мы разработали уникальный метод, позволяющий выявить белки, формирующие детергент-устойчивые агрегаты в различных тканях. Данный подход основан на базовой характеристике всех амилоидов – устойчивости к ионным детергентам, таким как SDS. Мы применили данную методику для выявления пока не охарактеризованных функциональных амилоидов в мозге молодых самцов крысы *R. norvegicus*. В результате протеомного скрининга в мозге крысы был выявлен ряд белков, формирующих детергент-устойчивые агрегаты, среди которых был МВР (Myelin Basic Protein). Про данный белок известно, что он является основным компонентом миелиновой оболочки. Миелин покрывает отростки многих нейронов и служит для изоляции аксонов, а также ускорения проведения нервного импульса (сальтаторное проведение). Ранее уже была показана способность коротких фрагментов белка МВР формировать амилоидоподобные фибриллы *in vitro*. Однако наша работа, в свою очередь, нацелена на анализ амилоидных свойств белка МВР в условиях *in vivo*.

С помощью методов полуденатурирующего электрофореза и фракционирования белкового лизата путем ультрацентрифугирования мы показали, что белок МВР представлен в мозге крысы в виде нерастворимых детергент-устойчивых олигомеров и агрегатов. Также методом иммуноокрашивания гистологических срезов мозга антителами к МВР мы наблюдали колокализацию исследуемого белка с амилоид-связывающим красителем Thioflavin-S. Это указывает на то, что белок МВР проявляет амилоидные свойства в миелинизированных нервных волокнах мозга крысы *R. norvegicus*.

Работа поддержана грантом РФФ № 14-50-00069.



Роль скафолдных белков в функциональной организации нервной терминали в норме и патологии

Шупляков О.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Институт трансляционной биомедицины, Лаборатория биологии синапсов.

Нейрональные скафолдные белки- это молекулы имеющие несколько модулей для взаимодействия (доменов), которые координируют действие белков-эффекторов в нервной клетке. Они участвуют в реорганизации цитоскелета и мембранных процессах, таких как слияние, образование и транспорт мембранных пузырьков, формирование клеточных отростков и эндоцитоз в различных частях нейрона. В результате посттрансляционных модификаций эти белки меняют свою конформацию, что приводит к смене связывающих партнеров и последующим структурным изменениям в клетке. Генетические нарушения функций этих молекул связывают с развитием нейродегенеративных заболеваний, что в первую очередь определяет интерес к изучению их функций. В настоящей работе мы исследовали роль белка-скафолда, интерсектина, в регуляции мембранного трафика в пресинаптической терминали. Наши исследования указывают, что интерсектин участвует в организации белкового матрикса контролирующего локализацию синаптических пузырьков у активной зоны синапса. Нарушение этой функции может приводить к нарушениям резервного пула синаптических пузырьков и образованию внутриклеточных белковых агрегатов.



Antipsychotic drug levomepromazine action on adult zebrafish behavior in novel tank test

Demin K.A.^{1,2}, Kalueff A.V.^{1,2,3*}

1 – Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

2 – Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

3 – School of Pharmacy, Southwest University, Chongqing, China

Electronic address: avkalueff@gmail.com.

Schizophrenia is an extremely debilitating psychiatric disorder. Levomepromazine is a neuroleptic drug that can be used for manic phases of bipolar disorder, and is also widely used in palliative care. However, little is known about its efficacy for schizophrenia. Mounting evidence suggests the use of zebrafish in antipsychotic drugs screening due to its high genetic and physiological homology to humans. Here we apply zebrafish novel tank test to study the effects of levomepromazine on their locomotion and behavior.

Behavioral testing was performed in adult wild-type outbred short-fin zebrafish between 11.00 and 17.00 h, using tanks (20x20x5 cm) with water adjusted to the holding room temperature, to assess zebrafish behavior. Prior to testing, fish were preexposed in a 0.5-L plastic beaker for 20 min to either drug-treated or drug-free water. For experiment, fish were randomly divided into 3 groups (n=9-10): drug-free control and fish preexposed to 25 mg/L or 50 mg/L of levomepromazine. Doses were chosen based on pilot studies in which higher (100 mg/L) resulted in ataxic responses. Zebrafish behavior was recorded on webcam and then processed in Noldus EthoVision XT 11.5. Was studied such behavioral endpoints as distance moved (cm), moving and not moving durations (s), time spent in the top part of tank (s) and number of transitions from bottom to top (n), absolute mean meandering (deg/cm). For statistical evaluation was used Kruskal-Wallis test with posthoc Dunn's test for pair comparisons of statistically significant KW data. Data is represented as Mean±SEM.

Overall, levomepromazine exposure alters zebrafish behavior, decreasing time spent moving ($p < 0.05$ for KW comparison, $p > 0.05$ for 25 mg/L and $p < 0.05$ for 50 mg/L in Dunn's test vs. control; 253.590±12.5572s, 196,462±21.7011s and 158.096±32.158 respectively), increasing time spent not moving ($p < 0.05$ for KW comparison, $p > 0.05$ for 25 mg/L and $p < 0.05$ for 50 mg/L in Dunn's test vs. control; 43.833±12.4763, 102.192±21.8682, 135.638±29.340 respectively), increasing absolute mean meandering ($p < 0.01$ for KW comparison, $p > 0.05$ for 25 mg/L and $p < 0.01$ for 50 mg/L in Dunn's test vs. control; 305.994±126.6485, 1177.727±380.0390, 7373.960±2977.579 respectively) and decreasing number of zone transitions ($p < 0.001$ for KW comparison, $p < 0.001$ for 25 mg/L and $p < 0.05$ for 50 mg/L in Dunn's test vs. control; 18.333±3.1091, 2.700±0.8699, 5.800±2.107 respectively). There was no difference in distance moved and time spent in the top half of tank ($p > 0.05$).

Taken together, this data suggests a mild hypolocomotor profile. Interestingly, giving changes in zone transitions and time spent in top that occurred in different directions compared to control, lower doses of the drug also seem to produce anxiolytic effect, which becomes anxiogenic in higher dose (182.8054±11.44136, 227.0210±22.62603, 136.9333±35,42235 for control, 25 and 50 mg/L doses).

Acknowledgements: Laboratory zebrafish maintenance for this project was performed by the Environmental Safety Observatory Bioelectronic Complex of SPSU. The reported study was funded by RFBR grant to AVK according to the research project № 16-01-00001 A. KAD is supported by RFBR grant № 18-34-00996.



Dopamine transporter knockout rats as a model of dopamine-related disorders

Evgeniya Efimova¹, Damiana Leo³, Ilya Sukhanov^{1,4}, Placido Illiano³, Liudmila Mus⁴, Stefano Espinoza³, Tatyana D. Sotnikova¹, Marius C. Hoener⁵ and Raul R. Gainetdinov^{1,2}

1-Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University

2-Skolovo Institute of Science and Technology

3-Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Neuroscience and Brain Technologies Department, Genoa, Italy.

4-Department of Psychopharmacology, Institute of Pharmacology, Pavlov Medical University

5-Neuroscience Research, Pharmaceuticals Division, F. Hoffmann-La Roche Ltd

Dopamine (DA) is known to be involved in many physiological functions including motor control, locomotion, emotional behavior, cognition and neuroendocrine regulation. Different psychiatric disorders including Parkinson's disease, substance abuse, schizophrenia, attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD) are known to be associated with dopamine system dysregulation. The dopamine transporter (DAT) plays an important homeostatic role in the control of both the extracellular and intraneuronal concentrations of dopamine, thereby providing effective control over activity of dopaminergic transmission. Previously developed DAT-knockout mice as a model had some limitations mostly due to considerably lower cognitive abilities of mice.

We present work on newly developed DAT knockout rats in which the gene encoding the DAT has been disrupted by using Zinc Finger Nuclease (ZFN) technology.

Male and female DAT-KO rats develop normally but weigh less than heterozygote and wild-type rats and demonstrate pronounced spontaneous locomotor hyperactivity. DAT knockout rats have significantly decreased total level of dopamine in striatum – down to 20% of wild type level and 3-4 fold increased levels of DA metabolites without major differences observed in serotonin and its main metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) levels. We also measured extracellular level of dopamine on freely moving rats using microdialysis technic with ultralow flow rate (0,1 ul/min). Despite decreased total level of dopamine, extracellular level of dopamine was 7-fold higher compared to level in wild type animals.

Hyperactivity of DAT-KO rats can be counteracted by amphetamine, methylphenidate, the partial Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) agonist RO5203648 ((S)-4-(3,4-Dichlorophenyl)-4,5-dihydro-oxazol-2-ylamine) and haloperidol. DAT-KO rats also demonstrate a deficit in working memory and sensorimotor gating tests, less propensity to develop obsessive behaviors and show strong dysregulation in frontostriatal BDNF function.

In summary, lack of DAT in rats results in disrupted clearance of released DA that affects both the extracellular and intraneuronal concentrations of DA. Behavior and amphetamine action prove that DAT knockout rats can become a valuable model for search for new drug treatment for dopamine associated disorders, such as ADHD.

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation grant 14-15-00131, 14-50-0069



Influence of adjacent sequences on amyloid aggregation

Grizel A.V.¹, Grizel A.V.¹, Rubel A.A.¹ and Chernoff Y.O.^{1,2}

1 – St. Petersburg State University, Institute of Translational Biomedicine, , Laboratory of Amyloid Biology, St. Petersburg, Russia

2 – Georgia Institute of Technology, School of Biological Sciences, Atlanta, Georgia, USA

Amyloids (cross-beta fibrous aggregates) and their transmissible forms (prions) cause diseases in mammals and control heritable traits in yeast. Amyloids and prions are widespread in biological systems and may play positive biological roles, e. g. in microbial adaptation, melanin polymerization, and memory. About 1% a human proteome is composed of proteins with domains that are similar by amino acid composition to prion domains of yeast proteins. *In vitro*, almost all proteins can form amyloids under certain conditions. However, it is still not understood how toxic amyloid conformation is suppressed for majority of the proteins in physiological conditions, and what enables some proteins to overcome this suppression.

Some eukaryotic proteins (e.g. amyloid precursor protein, PMEL, Sup35) with amyloidogenic regions contain additional domains that prevent the transition to toxic amyloid aggregates, and/or promote the formation of other assemblies such as liquid droplets and hydrogels. Despite the important role of domains adjacent to amyloidogenic regions in regulation of amyloidogenic their properties, mechanisms of such regulation are not well understood.

The purpose of our work is to elucidate the mechanism of the regulation of amyloid formation by regions adjacent to amyloidogenic domains, employing *in vivo* aggregation in yeast cells as a model.

Our data show that adjacent domains influence aggregation properties of amyloidogenic regions. The fusion of mammalian Aβ₄₂ peptide to prion domain of the yeast Sup35 protein (Sup35N-Aβ₄₂) promotes its aggregation and allows the chimeric protein to aggregate under conditions where Sup35 does not aggregate. However, the addition of sequences to both sides of the amyloid beta (Sup35N-Aβ₄₂-CFP) inhibits formation of amyloid aggregates, leading to the formation of non-amyloid-type assemblies instead (liquid droplets), that co-localize with stress-granules. Thus, mode of aggregation of amyloid regions depends on the nature and location of adjacent sequences. We hypothesize that the proximity to large structured or globular domains disrupts and in some cases, (even to potentially amyloidogenic domains not forming amyloids in given conditions) impairs amyloid formation aggregation due to steric hindrance, and in some case, promotes formation of alternative assemblies – liquid droplets and hydrogels. This effect is increased when adjacent sequences are located on both sides of the amyloidogenic region.

This work was supported by RSF grant 14-50-00069 and the SPbSU project 15.61.2218.2013. The authors acknowledge the SPbSU Resource Centers “Chromas”, “Molecular and Cell Technologies” and “Biobank” for technical support.



Effects of NMDA (ant)agonists and the nuclear chromatin receptors activator etimisol on zebrafish behaviour

Kalueff A.^{1,2,3*}, Demin K.^{1,2}, Yakovlev O.¹, Volgin A.¹, Piotrovckiy L.⁴, Litasova E.⁴

1 – Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

2 – Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

3 – School of Pharmacy, Southwest University, Chongqing, China

4 – Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

Electronic address: avkalueff@gmail.com

Since cognitive deficits are common for mood disorders, animal models are often used to find potential targets for their pharmacotherapy. Here we test three potential nootropic compounds acting through NMDA receptors and activation of nuclear chromatin receptors (etimisol) on zebrafish behavior in the novel tank test. Behavioral testing was performed between 11.00 and 17.00 h. Prior to testing, fish were pre-exposed in a 0.5-L plastic beaker for 20 min to either drug-treated or drug-free vehicle, 0.1% solution of DMSO, devoid of own behavioral effects in zebrafish, and commonly used in zebrafish drug studies. For treatment, fish were randomly divided into 4 groups (n = 15): drug-free control, 100 mg/L, 200 mg/L and 300 mg/L for NMDA antagonist, 130 mg/L, 260 mg/L and 390 mg/L for NMDA agonist and 5 mg/L, 10 mg/L and 20 mg/L for etimisol. Doses were chosen based on our pilot studies with this drug. Fish were then exposed to the novel tank test, assessing their anxiety, habituation and locomotion.

Results: Acute NMDA agonist (2-Methylimidazole-4,5-Dicarboxylic Acid) decreased adult zebrafish locomotion, as fish treated with 390 mg/L showed significantly lower rate of moving than did the control group and other groups tested ($p < 0.005$). Fish from the 390 mg/L cohort showed higher meander and turn angle ($P < 0.05$, T able 1) compared to normal control zebrafish. Interestingly, the rate of not moving was also higher in the 390 mg/L treated fish.

Acute NMDA-antagonist treatment with (2-Propylimidazole-4,5-Dicarboxylic Acid) showed that fish from both 200 and 300 mg/L groups cover shorter distance ($P < 0.05$) and have lower velocity compared to the control group. Meander was higher in the 300 mg/L group ($P < 0.05$). Compared to control fish, the ‘moving’ was also significantly lower in the 300 mg/L treated zebrafish ($p < 0.05$). The rate of not moving was also higher in the 300 mg/L treated fish.

Collectively, this profile suggests hypolocomotor effects in zebrafish treated with both acute NMDA agonist and antagonist.

In contrast, etimisol-treated fish showed no statistical differences vs. controls.

While no per-minute habituation changes were observed in NMDA agonist and antagonist experiment for both Group and Minute factors, it is evident that both NMDA-agonist and antagonist had minute and dose effect for in zone top rate and zone transition.

Conclusion: In summary, zebrafish behavioral phenotype under NMDA antagonists presented as decreased locomotor activity and, clearly, may expand beyond direct NMDA-receptor agonism/antagonism. More thorough analyses of habituation profile and other cognitive phenotypes is needed. The sensitivity of fish to both drugs tested supports the growing utility of zebrafish as powerful biological sensors and screens for glutamatergic nootropic drugs. Further experiments evaluating zebrafish memory in T-maze are needed to better understand the exact effect on these compounds on zebrafish short- and long-term memory.



Covalent binding of modified Sos1-derived peptide and N-terminal SH3-domain of adapter protein Grb2

Luzik D.A.¹, Rogacheva O.N.^{1,2}, Izmailov S.A.¹, Indeykina M.A.³, Tyuryaeva I.I.^{1,4}, Bushmanova E.L.¹, Podkorytov I.S.¹, Skrynnikov N.R.^{1,5}

1 – Laboratory of Biomolecular NMR, Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, 199034

2 – Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg 199034

3 – Emanuel Institute for Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow 119334

4 – Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg 194064

5 – Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette IN 47906, USA

Bioconjugation techniques are widely used in the area of imaging, drug delivery, mapping of protein interactions, etc. One particularly intriguing line of research is development of irreversible inhibitors for use in targeted therapy, including covalent peptidic ligands. In this context, it should be useful to develop a modeling technique to assess the feasibility of covalent binding and to predict possible changes in target protein structure in response to ligand binding.

To develop such computational technique, we have chosen the model system consisting of N-terminal SH3 domain from adapter protein Grb2 and its Sos1-derived peptide ligand containing non-native reactive C-terminal residue (chloroacetyl lysine, X'). The modified peptide initially binds to its target non-covalently before reacting with the proximal cysteine on the surface of the protein. We have undertaken a comprehensive experimental study of this system using SDS-PAGE, heteronuclear 2D and 3D NMR spectroscopy and LC-MS/MS technique. Using these methods, we have determined the time constant of the reaction (several hours at physiological conditions). We have also profiled its pH dependence, demonstrating that the reaction involves the cysteine thiolate anion. In addition, we have established that the resulting covalent complex contains the thioether bond between X' and the specific protein residue C32. Finally, we have shown that formation of this bond leads only to minor structural perturbations compared to the non-covalent complex.

Based on these experimental observations, we have designed an MD-based protocol to model the conjugation of Sos1X' with Grb2 N-SH3. Specifically, we have derived a set of force-field parameters necessary to model the non-native reactive amino acid, chloroacetyl lysine, as well as the resulting thioether linkage. We have also devised a procedure to model the formation of covalent bond without any significant perturbations to the macroscopic parameters of the MD simulation. A series of MD simulations with the net length of several microseconds led to high-quality atomic models of Grb2 N-SH3 / Sos1X' conjugates. We have used these models to predict NMR chemical shift changes that occur upon the covalent binding. The results are in good agreement with our experimental data. We believe that the new methodology presented in this work will be useful to engineer covalent peptide inhibitors of oncogene proteins, as well as other proteins implicated in human disease. In particular, this strategy can be used to target extracellular domains of cell-surface receptors, e.g. GPCR family.

The work was supported by the RSF grant 15-14-20038.



Optogenetics: Applications in neurobiology

Mikhailova M.A.¹, Budygin E.A.^{1,2}, Gainetdinov R.R.¹

1 – Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

2 – Department of Neurobiology and Anatomy, Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA

The brain is composed of billions of neurons which form innumerable connections with each circuit having multiple firing properties, biochemical signals, and wiring patterns. Pathways of various lengths and expanse communicate in such a way that they not only control neighboring circuits, but they are themselves controlled by surrounding networks. Multiple neurotransmitters are released with different patterns and consequent reuptake in order to achieve this complicated interaction. Therefore, brain tissue has a heterogeneous nature and selectively hampers controlling subsets of well-defined neuron types in intact circuits. For complete understanding different brain disorders, it is necessary to identify the underlying neural circuits using precise and specific methods and approaches. Despite the progress made in the 20th century using neuromodulation techniques (i.e., electrical stimulation or pharmacologic intervention), many questions remain regarding the exact circuitries and neurochemical mechanisms which are responsible for certain pathological conditions. Indeed, it has been incredibly difficult to completely discern the underlying triggers with these traditional tools. This is simply due to technical limitations that preclude their use to dissect cell-type or pathway-specific function of a behavioral response. In fact, previous approaches either simultaneously affected all types of cells and processes in the targeted area, or had slow kinetics and reversibility.

Advancement of molecular genetics has created revolutionary improvements in studying normal and pathological brain functioning. Since Karl Deisseroth and colleagues developed optogenetics via microbial opsin engineering (genetic methods and optical instruments for guiding light to activate or inhibit the specific neural circuits to manipulate behavior with temporal precision), it has been well applied into fundamental research in a diversity of neural circuits related with different kinds of behaviors and pathogenic mechanisms of brain diseases (Boyden et al., 2005; Tye and Deisseroth, 2012).

Moreover, the recent emergence of these tools provides a new means for establishing the causal relationships between neural activity and behavior. Optogenetics use a combination of genetic and optical methods to control the events in specific cells of living tissue even within freely moving animals. This provides a means to experimentally control the activation of specific neuronal sub-populations in heterogeneous brain regions where multiple neuronal subtypes exist and to do so with exquisite temporal precision (Deisseroth et al., 2006). This tool can uniquely assist in establishing causality between the disorder and the underlying biology. As we examine various neurological disorders and diseases with precise tools such as optogenetics, the data guide the approaches to treatments and cures to become similarly more focused.

This work was supported by RSF grant 14-50-00069



Aversive stimulus triggers phasic changes in striatal dopamine release in freely moving and anesthetized rats

Onokhin K.V.¹, Mikhailova M.A.¹, Budygin^{1,2}, Gainetdinov R.R.¹

1 - Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

2 - Department of Neurobiology and Anatomy, Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA

The perception and consequences of pleasurable and negative stimuli are different, and the underlying substrates mediating these opposing phenomena are unclear. Dopamine signaling in the ventral tegmental area - nucleus accumbens circuitry is involved in the integration of sensory information and the initiation of the subsequent behavioral responses to diverse stimuli. Therefore, accumbal dopamine release is a logical starting point for the exploration of the diversity and similarity in neurochemical mechanisms of pleasure and aversion. It is well documented that subsecond increase in dopamine release in the nucleus accumbens can be observed with the presentation, seeking and anticipation of reward, as well as learning of reward-related information. To address the fundamental question of whether and how dopamine neurotransmission within the nucleus accumbens encodes aversive stimuli, we have assessed dopamine dynamics in real time in response to the classical aversive stimulus, a tail pinch using fast-scan cyclic voltammetry in freely moving and anesthetized rats. A tail pinch induced a significant increase in extracellular dopamine concentrations in the nucleus accumbens core of both freely moving and anesthetized rats. The maximal dopamine concentrations did not significantly differ between these groups (49.5 ± 5.9 vs 43.8 ± 2.8 nM, $P > 0.05$). Dopamine release is triggered in the dorsal striatum and nucleus accumbens (NAc) core by tail pinch and is time locked to the duration of the stimulus, indicating that the dorsal striatum and NAc core are neural substrates, which are involved in the perception of aversive stimuli. However, dopamine is released in the NAc shell only when tail pinch is removed, indicating that the alleviation of aversive condition could be perceived as a rewarding event. Furthermore, a sensitized response to an unpainful stimulus, such as a touch, was discovered following multiple noxious stimuli given in short intervals. Taken together, these results suggest an important role for subsecond DA signaling in the nucleus accumbens core in response to aversive stimuli and possible subsequent sensitization.



ESR spectroscopy as a probe of protein dynamics: an insight from long MD simulations

Рабдано С.О.¹, Измайлов С.А.¹, Подкорытов И.С.¹, Cunningham T.F.², Jaroniec C.P.³, Saxena S.², Скрынников Н.Р.^{1,4}

1 – Laboratory of Biomolecular NMR, Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg 199034

2 – Department of Chemistry, University of Pittsburgh, Pittsburgh PA 15260, USA

3 – Department of Chemistry & Biochemistry, Ohio State University, Columbus OH 43210, USA

4 – Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette IN 47906, USA

ESR spectroscopy using nitroxyl spin labels is a widely used tool to probe protein dynamics. However, the relationship between different dynamic processes influencing the orientation of the nitroxyl group and the resulting ESR lineshape is understood only tentatively. In this contribution, we use MD simulations of the model protein, B1 domain of immunoglobulin G binding protein (GB1), to dissect the effect of protein structure and dynamics on the ESR spectra from MTSL spin labels attached to cysteine residues at different sites throughout the protein.

The 10 μ s trajectories have been recorded for GB1 mutants N8C, K10C, E15C, K28C and T44C carrying MTSL at the respective cysteine sites. These trajectories were further used to simulate the ESR spectra using (i) the rigorous Liouville - von Neumann equation for time evolution of the spin-density matrix and (ii) the widely used approximate Redfield theory. As it turns out, Redfield treatment works well for GB1 in aqueous solution. In turn, this means that certain trademark features of the ESR spectra (e.g. multiplet asymmetry) can be nicely explained by invoking the concept of cross-correlations, which proved to be extremely useful in the context of NMR spectroscopy and, more specifically, in relation to the famous TROSY experiment. The similarity is particularly evident considering the ESR spectra of the GB1 tagged with ¹⁵N-labeled MTSL.

In order to identify the motional determinants of ESR spectra, we have analyzed the MD data as expressed in three different frames of reference: (i) the cysteine backbone frame, (ii) the molecular frame, and (iii) the laboratory frame. By extracting the MTSL dynamics relative to these three frames we were able to get a handle on side-chain dynamics, backbone dynamics and overall tumbling and further quantify their effect on the broadening and asymmetry of the ESR spectra. As it turns out, side-chain dynamics is the dominant factor that determines the shape of the spectrum. In turn, side-chain dynamics is dictated by the placement of the nitroxyl tag, i.e. the steric constraints imposed by the protein scaffold or, otherwise, stemming from the side-chain contacts on the protein surface. The ability of the MTSL tag to engage into site-specific interactions also plays a role. Of particular interest is the influence of steric restraints that occur as a consequence of intermolecular interactions or large conformational rearrangements within the protein structure.

This work has been supported by the RSF award 15-14-20038.



Analysis of interactions between mammalian amyloids in yeast-based model

Rubel A.A.¹, Kachkin D.V.¹, Lashkul V.V., Chernoff Y.O.^{1,2}

1 – St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

2 – School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia, USA

Amyloids are fiber-like ordered aggregates, generated via intermolecular cross-beta interactions. Amyloid fibrils and amyloid-related protein aggregates are associated with a variety of human diseases, including such widespread disorders as Alzheimer disease (AD), Parkinson's disease (PD), transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) such Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), type 2 diabetes (T2D), etc. Existing data demonstrate that some amyloids, produced by different proteins, can interact to each other. Co-localization of various aggregates has been demonstrated for such proteins as PrP (mammalian prion protein, associated with TSEs), amyloid beta (Abeta) and tau (associated with AD). Several reports described simultaneous presence and colocalization of Abeta and PrP aggregates in CJD patients. Epidemiological studies point to increased incidence of AD among the patients with T2D (associated with aggregation of the IAPP peptide). Previously, we have shown that yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a reliable model system for studying interactions between different mammalian amyloids. By using yeast, we have confirmed direct interaction between PrP and Abeta aggregates, and identified the PrP sequences that are essential for the interaction. Here, we apply a yeast model to studying interactions between IAPP and Abeta, tagged CFP and YFP. Chimeric amyloidogenic proteins form detergent resistant aggregates in yeast cells. By using FRET, we demonstrate that Abeta and IAPP both co-localize and physically interact to each other. To our knowledge, this is the first evidence of direct interaction between IAPP and Abeta *in vivo*. We hypothesize such an interaction may play an important role in seeding Abeta aggregation in the T2D patients, resulting in AD development.

This work was supported by grant from RSF (14-50-00069). Authors acknowledge the SPbSU Resource Centers «Biobank», «CHROMAS» and «Molecular and Cell Technologies» for technical support.



Cellular transparency in vivo: the search for possible mechanisms

Zayas A.¹, Zueva L.^{1,2}, D.Rios¹, Meshalkina D.³, Makarov V.⁴, Volnova A.³, Kucheryavikh I.¹, Inyushin M.¹

1 – Universidad Central de Caribe, Medical School, PR 00960, USA

2 – I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, 194223, Russia

3 – Institute of Translational Biomedicine, 199034, Russia

4 – University of Puerto Rico Rio Piedras, PR 00925, USA

Why one particular cell in vivo is transparent while another is not? Modern methods of in vivo optical imaging: in vivo optical recording of cellular activity, fluorescent probe cellular microchemistry, neuronal optostimulation, optogenetics, in vivo arteriosclerotic research: all these technologies would benefit from in vivo transparent tissue. Using optical and electron microscopy immunostaining methods we have found that α A-crystallin protein abundantly present in transparent cells of the vertebrates optical tract (crystal lens, cornea), is also present in other transparent cells from the retina (Müller cells, cones) from different vertebrate classes (birds, anurans, mammals). Abundance of one particular substance in exclusively transparent cells in vertebrates suggest that α A-crystallins can be the cause of the cellular transparency: two possible physical mechanisms are discussed. This finding may help to develop the genetic approach to make cells transparent: the gene α A-crystallins are well known, for transgenes with α A-crystallins abundantly expressed in neurons and astrocytes may have a very transparent brain, animals with naturally transparent skin can be developed as well. Development of model animals with transparent tissue is only one of possible outcomes, this work may contribute do general knowledge on the genetics of biological transparency.

This work has been supported by NIH SC2GM111149 Grant.



КОМПАНИЯ ООО «БИОГЕН-АНАЛИТИКА»

Российская компания БИОГЕН-АНАЛИТИКА основана в 2004 году. Мы эффективно используем накопленные профессиональные знания и умения для обеспечения наших заказчиков продукцией и услугами в сферах образования, науки и медицины, а также в других областях, непосредственно связанных со здоровьем и благополучием нашей страны.

БИОГЕН-АНАЛИТИКА активно сотрудничает с институтами Министерства образования и науки Российской Федерации, Российской Академии Наук, Министерства здравоохранения Российской Федерации, научными и производственными предприятиями, коммерческими организациями, государственными учреждениями и является одним из ведущих поставщиков современных комплексных решений.



БИОГЕН-АНАЛИТИКА видит своей главной целью обеспечение клиентов полным спектром самых современных технических решений при постоянном внедрении новейших мировых технологий и оборудования в России и других странах СНГ.

Только вместе мы сделаем нашу страну лучше!!!!

История

1996 Создана фирма Grohmann Ges.m.b.H. (Материнская компания). Открытие офиса в Москве. Фирма является авторизованным дилером Beckman Coulter Inc.

2001 Открытие офиса в Минске.

2004 Создание ООО «БИОГЕН-АНАЛИТИКА»

2006 Открытие Новосибирского офиса.

2008 Создание VolgarLab-2008 Ltd.

2010 Фирма начала работу с новыми производителями.

2012 Ребрендинг фирмы.

2017 Открытие офиса в Санкт-Петербурге.

Наша территория – вся Россия

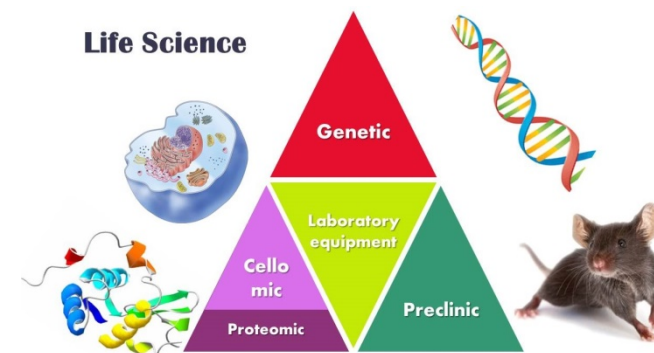


БИОГЕН-АНАЛИТИКА имеет 3 офиса. Офисы расположены в 3-х крупнейших городах России (Москва, Санкт-Петербург и Новосибирск), наиболее интересных с точки зрения нашего бизнеса.

Персонал

Наши сотрудники имеют отличное профильное образование и опыт, прошли обучение у производителей оборудования и всегда готовы помочь пользователю с подбором технологии решения, экспериментальных задач оптимальным способом. Наша высококвалифицированная сервисная служба готова решить все проблемы, возникающие при эксплуатации оборудования.

Наши сферы деятельности



Мы поставляем

Центрифуги

Микроскопы

Низкотемпературные морозильники

Генетические анализаторы

Системы электрофореза

Системы визуализации для электрофореза

Системы выделения ДНК

Системы выделения одиночных клеток и колоний

Анализаторы клеток

Сортеры клеточные

Синтезаторы пептидов

Оборудование для пробоподготовки и белкового анализа

Системы содержания животных

УЗИ для животных

Системы физиологического мониторинга

Системы in vivo визуализации для животных

Томография для животных

Другое оборудование, востребованное нашими клиентами.



Наши основные партнеры



Наша маркетинговая активность

Мы активно работаем в области обучения наших клиентов новейшим методам работы. БИОГЕН-АНАЛИТИКА проводит семинары, тренинги, участвует в конференциях и школах организуемых нашими клиентами.

Компания принимает участие в крупнейших профильных выставках: Аналитика Экспо, Биотехнология и других ...

Мы постоянно информируем пользователей о наших новостях и новинках партнеров путем общей и адресных рассылок.

Наш сайт содержит огромное количество полезной информации об оборудовании, методиках, научных статей и прочих материалов.

www.bga.su

Наши контакты:

ООО «БиоГен-Аналитика»

127422, Москва,
ул. Тимирязевская, д. 1, стр. 2

Тел./факс: +7 499 704 62 44

84997046244@bga.su

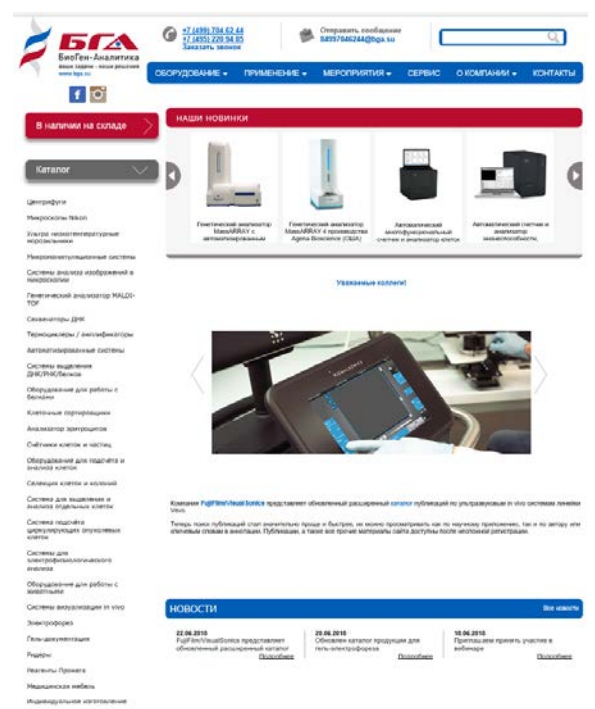
www.bga.su

«Любая достаточно ушедшая вперед технология неотличима от чуда.»

Артур Кларк

«Прогресс науки определяется трудами ее ученых и ценностью их открытий.»

Луи Пастер





Компания СкайДжин предлагает к поставке со склада в Москве и под заказ наборы реагентов, оборудование, расходные материалы, реактивы, а также специализируется на сервисном обслуживании и поверке дозаторов, лабораторных весов различных производителей. Мы предлагаем гибкие условия работы и очень большой ассортимент продукции.

Поставляемая нашей компанией продукция широко используется в научно-исследовательских лабораториях и R&D центрах, лабораториях секвенирования, при решении практически любых молекулярно-биологических задач.

Большая часть производителей в нашем портфолио - это прямые, эксклюзивные поставки. Мы являемся первым звеном в поставках для таких компаний как New England Biolabs, Agilent Technologies, Oxford Nanopore Technologies, QIAGEN, 10x Genomics, NIMAGEN, Integrated DNA Technologies, Thermo Fisher Scientific, SIGMA-ALDRICH, BioSan, Gilson.

К флагманским продуктам наших линеек относятся:

- Набор для пробоподготовки образцов от New England Biolabs ULTRA II FS с интегрированной системой фрагментации и другие наборы серии ULTRA для образцов ДНК, РНК и микроРНК;
- Digital NGS: готовые панели и наборы для обогащения на основе ПЦП от QIAGEN с мономолекулярным баркодированием;
- Специализированные наборы для работы с микроРНК и анализа экспрессии от QIAGEN-Exiqon;
- Нанопоровые секвенаторы третьего поколения: портативный секвенатор MinION, высокопроизводительный секвенатор GridION;
- Уникальная система Chromium производства 10x Genomics для автоматической пробоподготовки геномов и транскриптомов единичных клеток.

За дополнительной информацией о производителях, товарах, ценах и условиях поставки обращайтесь к нашим квалифицированным специалистам.

Будем рады ответить на Ваши вопросы и помочь выбрать качественное и недорогое решение для Ваших задач!

ООО «СкайДжин»
Адрес: 115093, Москва,
ул. Люсиновская, д. 36, стр. 1
Тел: 8 (495) 215 02 22
info@skygen.com
www.skygen.com



ООО «Рош Диагностика Рус» – официальный импортер продукции Roche в России и лицензиат компании F.Hoffmann–La Roche Ltd. Отдел молекулярной диагностики (Roche Molecular Diagnostics) разрабатывает, создает и выводит на рынок диагностические решения, базирующиеся на патентованной технологии Roche – полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Каждое из этих решений включает в себя оборудование, реагенты, протокол выполнения и автоматизированные аналитические алгоритмы.

В *практической медицине* молекулярно-диагностические платформы Roche активно используются для скрининга донорской крови, выявления и мониторинга вирусов ВИЧ, гепатитов, папилломы, бактериальных инфекций, а также для диагностики наличия известных мутаций в генах ассоциированных с онкологическими заболеваниями.

Для *научных лабораторий* Roche предлагает:

- Инновационные открытые ПЦР-анализаторы в реальном времени LightCycler 96 и LightCycler 480 II
- Высококачественные наборы для выделения нуклеиновых кислот и реагенты для ПЦР
- Решения для направленного отбора генов с последующим секвенированием NGS: NimbleGen – технология гибридизации с ДНК зондами, HEAT-seq технология амплификация с использованием молекулярных баркодов.
- Комплексное решение AVENIO для исследования мутаций в генах, ассоциированных с онкологией методом NGS
- Компания Roche предлагает комплексные решения, включающие в себя не только оборудование и реагенты, но и технический сервис, обучение персонала и постоянную методическую поддержку.

ras.russia@roche.com

www.dialog.roche.com

Тел.: +7 (495) 229-69-99

Факс: +7 (495) 229-62-64

115114, Россия, Москва, ул. Летниковская, д. 2, стр. 2, Бизнес-центр «Вивальди Плаза»

