



Санкт-Петербургский
государственный
университет



Ежегодная конференция
Института Трансляционной Биомедицины
СПбГУ (ИТБМ СПбГУ)

**«Актуальные проблемы
трансляционной биомедицины
2022»**

сборник тезисов

25-26 июля 2022

ACCELLENA
RESEARCH



Генетическая и эпигенетическая пластичность множественной миеломы

Аксенова А.Ю.¹, Жук А.С.², Степченкова Е.И.^{3,4}, Качкин Д.В.¹, Грицаев С.В.⁵

1. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Научная лаборатория биологии амилоидов, Университетская наб., д. 7/9, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 199034
2. ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Кронверкский пр., д.49, лит. А, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197101
3. ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН», Санкт-Петербургский филиал, Университетская наб., д. 7/9, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, 199034
4. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», кафедра генетики и биотехнологии, Университетская наб., д. 7/9, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 199034
5. ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России», ул. 2-я Советская, д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024

Высокая генетическая гетерогенность заболевания считается одной из главных причин разной эффективности лекарственных препаратов и различий в беспрогрессивной выживаемости у больных Множественной Миеломой (ММ). Благодаря высокой пластичности генома опухолевые клетки приобретают устойчивость к лекарственным препаратам, а также способность противостоять иммунной системе и сигналам, регулирующим пролиферацию клеток. В конечном счете это предопределяет неизбежную прогрессию заболевания. Мутагенные процессы, проходящие в геноме ММ, приводят к накоплению большого количества разнообразных генетических нарушений, таких как однонуклеотидные замены и вставки/выпадения нуклеотидов, изменения копийности фрагментов и целых хромосом, хромосомные перестройки. Также, в ходе эволюции опухоли в геноме ММ могут происходить катастрофические изменения, такие как мутационный катаегис и хромотрипсис, полностью изменяющие геномный ландшафт. ММ является одной из самых изучаемых опухолей человека, однако молекулярные механизмы, обеспечивающие высокую динамику генома ММ и клональную эволюцию опухоли остаются плохо изученными. Нехватка данных о молекулярно-генетических механизмах развития заболевания, а также о связи тех или иных генетических нарушений с терапией, остается острой проблемой. Поиск новых факторов, определяющих предрасположенность к развитию ММ, особенности течения заболевания и



ответ на терапию продолжается. Динамика теломерных последовательностей и факторы эпигенетической природы могут вносить вклад в развитие ММ, наряду с мутациями предрасположенности, драйверными мутациями и структурными изменениями генома.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 20-15-00081.

Aksenova, A.Y.; Zhuk, A.S.; Lada, A.G.; Zotova, I.V.; Stepchenkova, E.I.; Kostroma, I.I.; Gritsaev, S.V.; Pavlov, Y.I. Genome Instability in Multiple Myeloma: Facts and Factors. *Cancers* 2021, 13, 5949. <https://doi.org/10.3390/cancers13235949>

Elena A Radchenko, Anna Y Aksenova, Kirill V Volkov, Alexander A Shishkin, Youri I Pavlov, Sergei M Mirkin, Partners in crime: Tbf1 and Vid22 promote expansions of long human telomeric repeats at an interstitial chromosome position in yeast, *PNAS Nexus*, 2022,; pgac080, <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgac080>

А.Ю. Аксенова, А.С. Жук, Е.И. Степченкова, С.В. Грицаев Стратификация больных множественной миеломой: современное состояние вопроса и дальнейшие перспективы. *Клиническая Онкогематология* 2022, т. 15, № 3, в печати.



Анализ соматических мутаций генов рецепторов следовых аминов при колоректальном раке на основании данных репозитория cBioPortal

Ваганова А.Н.¹, Канов Е.В.¹, Гайнетдинов Р.Р.¹

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

Установлено, что агонисты рецептора следовых аминов 1-го типа (TAAR1) обладают цитостатическим и проапоптотическим эффектом в отношении клеточных линий, происходящих из злокачественных опухолей. Поскольку TAAR1 экспрессируется в эпителии дистальных отделов кишечника, представляется перспективной возможность применения агонистов этого рецептора в составе комбинированной терапии колоректального рака. Однако делеции и мутации гена, в конечном итоге влияющие на функцию рецептора, могут снижать эффективность подобных методов лечения. Поэтому нами была проведена работа по оценке вероятности указанных изменений в генах TAAR1-9 в опухолях толстой кишки.

Исследование проводилось с использованием данных репозитория cBioPortal, находящихся в свободном доступе. Репозиторий содержит результаты секвенирования геномов злокачественных опухолей 1789 пациентов с колоректальным раком. Влияние миссенс-мутаций оценивалось с использованием web-приложений PROVEAN, SIFT и PolyPhen2. Замена считалась влияющей на функцию белка, если на это указывали результаты анализа по крайней мере двух программ или же она затрагивала аминокислотный остаток, подверженный пост-трансляционным модификациям (метилованию, фосфорилированию, ацетилированию).

Делеции генов TAAR были отмечены у 10 пациентов, у 70 пациентов присутствовали однонуклеотидные миссенс-мутации, при этом у 16 пациентов было выявлено более одной мутации. Общее количество пациентов с мутациями генов TAAR составило 4,3 %, при этом 43,6 % этих мутаций вероятно являлись доброкачественными и не оказывали влияния на функцию рецепторов. Миссенс-мутации и делеции TAAR1 были выявлены у 1 % пациентов, при этом 30 % из них вероятно не оказывали влияние на функцию продукта гена. Мутации TAAR значительно чаще ($P < 0.01$) выявлялись в



опухолях с микросателлитной нестабильностью и высоким числом мутаций и реже ($P < 0.01$) — в опухолях с хромосомной нестабильностью.

Таким образом, присутствие мутаций в генах TAAR является относительно редким явлением при колоректальном раке, а мутации гена TAAR1, влияющие на функциональное состояние его продукта выявляются менее чем у 1 % пациентов. Следовательно, низкая мутационная изменчивость гена TAAR1 в колоректальных опухолях позволяет рассматривать его в качестве мишени терапии данных злокачественных новообразований.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-30008.



Анализ эволюционной консервативности амилоидных свойств белка FXR1 в головном мозге позвоночных

Велижанина М.Е.^{1,2}, Галкин А.П.^{3,4}

1. Лаборатория Биологии Амилоидов, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия
2. Лаборатория сигнальной регуляции, ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург, Россия
3. Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия
4. Кафедра генетики и биотехнологии, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

Амилоидами называют белки, которые способны к образованию неразветвлённых фибрилл, формирующиеся за счет упорядоченных межмолекулярных β -слоев. Структура амилоидных белков определяет их уникальные физические свойства: их фибриллы обладают особой устойчивостью к воздействию различных факторов. Как правило, под термином «амилоиды» воспринимают группу белков, вызывающих неизлечимые заболевания человека, такие как болезни Альцгеймера, Паркинсона и др. Однако роль амилоидные белки в норме могут регулировать жизненно важные процессы, то есть являться функциональными.

Ранее мы продемонстрировали, что РНК-связывающий белок FXR1 функционирует в амилоидной форме в мозге крыс. Известно, что FXR1 влияет на память и психоэмоциональное состояние, а нарушения его работы связаны со множеством патологий: от ментальных расстройств и моторной дисфункции до онкологических заболеваний.

N-терминальная часть белка, играющая ключевую роль в амилоидогенезе FXR1 у крысы, удивительно консервативна у позвоночных. Однако до проведения настоящей работы оставалось неясным, насколько амилоидный способ укладки FXR1 распространён среди разных групп позвоночных животных. В данной работе мы решили оценить, на каком этапе эволюции амилоидные фибриллы белка FXR1 стали конститутивным компонентом нейронов головного мозга. Для этого мы провели ряд экспериментов в полифилетической группе организмов: домашней курице (*Gallus gallus*), красноухой черепахе (*Trachemys scripta*) и шпорцевой лягушке (*Xenopus laevis*). Мы показали колокализацию FXR1 с амилоид-специфичными красителями в нейронах всех исследованных представителей позвоночных. В мозге амфибий,



рептилий и птиц белок FXR1 представлен в форме детергент-устойчивых агрегатов. Белок FXR1, выделенный методом иммунопреципитации, образует фибриллы, которые после окрашивания конго красным проявляют характерное для амилоидов двулучепреломление желто-зеленого цвета.

В совокупности, полученные нами результаты позволяют сделать вывод, что белок FXR1 присутствует в мозге исследованных организмов в амилоидной форме, а его амилоидные свойства являются эволюционно консервативными.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №22-24-00451.



Атомоксетин, ингибитор обратного захвата норадреналина, как модулятор поведения DAT-нокаутных крыс

Вольнова А.Б.^{1,2}, Курзина Н.П.², Пелевин А.Л.¹, Бельская А.Д.^{1,2}, Громова А.А.¹, Гайнетдинов Р.Р.^{2,3}

1. Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия

2. Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

3. Клиники высоких медицинских технологий имени Н. И. Пирогова СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) – одно из широко распространенных нейropsychиатрических заболеваний. Для выяснения механизмов его возникновения используется модель животных, нокаутных по гену транспортера обратного захвата дофамина DAT (DAT-KO крысы). Известно, что в реализации сложных форм целенаправленного поведения необходимо участие префронтальной коры, взаимодействие в этой области коры норэпинефрина и дофамина является важным фактором регуляции поведения. Для лечения СДВГ используются атомоксетин (АТХ), блокатор белка-транспортера, осуществляющего обратный захват норэпинефрина и дофамина (NET). Представлялось важным выяснить, как блокада NET влияет на пространственную память и процессы внимания у DAT-нокаутных крыс.

Исследование пространственной рабочей памяти проводили в лабиринте Хебба-Уильямса, параметры непроизвольного внимания оценивали в установке для регистрации преимпульсного торможения (PPI). Было использовано 10 DAT-KO крыс и 10 крыс дикого типа (WT). Животных тестировали при внутрибрюшинном введении за 30 мин до эксперимента физиологического раствора либо АТХ в дозе 3 мг/кг.

Было выявлено, что у животных WT введение АТХ приводило к увеличению времени и расстояния, пройденного до целевого отсека, они больше времени проводили в ошибочных секторах и чаще посещали их по сравнению с тестированием после введения физиологического раствора. Количество персеверативных реакций и параметры непроизвольного внимания достоверно не изменялись.



У DAT-КО крыс введение АТХ не оказало значимого влияния на поведение животных по сравнению с введением физиологического раствора, достоверно увеличилось лишь количество заходов в зоны ошибок, а число perseverативных реакций уменьшалось. В тесте РРІ у животных группы DAT-КО после АТХ наблюдалось увеличение преимпульсного торможения до значений, характерных для крыс WT.

Можно предположить, что введение АТХ в использованной дозе контрольным животным ухудшало пространственную ориентацию, не оказывая значимого эффекта на процессы внимания. У DAT-КО крыс введение АТХ, снижая число perseverативных реакций, опосредованно улучшало процессы внимания. В пользу этого также свидетельствует улучшение процессов произвольного внимания у DAT-КО крыс в тесте РРІ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 21-75-20069.



***De novo* секвенирование белков по небольшим наборам тандемных масс-спектров «сверху вниз» с ECD-фрагментацией ионов**

Вяткина К.В.^{1,2,3}, W. Liu⁴, J. Shaw⁵

1. Лаборатория биоинформатики и математической биологии, СПбАУ РАН им. Ж.И. Алферовва, г. Санкт-Петербург, Россия
2. Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия
3. Кафедра МО ЭВМ, факультет компьютерных технологий и информатики, СПбГЭТУ «ЛЭТИ», г. Санкт-Петербург, Россия
4. University of Notre Dame, Notre Dame, IN, USA
5. e-MSion, Inc., Corvallis, OR, USA

Современная масс-спектрометрия представляет собой наиболее эффективный и широко используемый метод исследования белков и пептидов. В последние годы все большую популярность приобретает технология «сверху вниз» (top-down), в соответствии с которой белковые молекулы анализируются целиком, без предварительного расщепления на пептиды. Масс-спектры, получаемые с ее применением, весьма информативны, однако их интерпретация представляет собой сложную задачу. Таким образом, возникает необходимость в разработке быстрых и надежных алгоритмов для этих целей.

В рамках данной работы нами был предложен алгоритм *cz*-Twister для *de novo* секвенирования белков по небольшим наборам тандемных масс-спектров «сверху вниз» с фрагментацией молекулярных ионов методом диссоциации с захватом электрона (electron capture dissociation, ECD). В его основе лежит концепция *cz*-графа – обобщенного спектрального графа, который строится для деконволюированных масс-спектров. Вершины *cz*-графа сопоставляются парам пиков, сумма масс которых превышает массу молекулярного иона приблизительно на 1 Да; таким образом, они потенциально соответствуют парам комплементарных *c*- и *z*-ионов. Ребра же проводятся между вершинами, которые могут соответствовать последовательным парам комплементарных ионов. При помощи *cz*-графа восстанавливаются длинные участки аминокислотной последовательности изучаемого белка, а пробелы между ними далее заполняются с использованием *c*- и *z*-ионов, для которых в масс-спектрах отсутствовали комплементарные.



Алгоритм *cz*-Twister был реализован на языке программирования Java и протестирован на наборе из шести ECD-спектров убиквитина, полученных с использованием модифицированного масс-спектрометра Thermo Q Exactive HF при разрешении 240000 для MS и 120000 для MS/MS на m/z 400. Масс-спектры были деконволюированы при помощи программы Thermo Xtract и преобразованы в формат mgf программой MSConvert 3.0 (ProteoWizard). Метод *cz*-Twister полностью восстановил аминокислотную последовательность убиквитина, затратив на это менее 9 секунд на современном ноутбуке.

На следующем этапе исследований подход *cz*-Twister будет адаптирован для анализа модифицированных форм белков.



Острые и хронические поведенческие эффекты ацетилсалициловой кислоты у зебраданио (*danio rerio*)

Галстян Д.С.¹, Демин К.А.¹, Колесникова Т.О.¹, Калуев А.В.¹.

1. Институт трансляционной биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия, Институт экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова, Санкт-Петербург, Россия

Циклооксигеназа - 2 (ЦОГ - 2) является одним из основных ферментов биосинтеза тромбоксанов и простагландинов, которые могут принимать участие в процессах нейровоспаления, связанных со многими психическими заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, депрессия и др. В связи с этим, целью нашего исследования было оценить острую и хроническую поведенческие эффекты ацетилсалициловой кислоты (АК), в качестве ингибитора ЦОГ, с использованием рыб зебраданио в качестве модели.

В остром и хроническом экспериментах использовали по 32 взрослых короткоперых зебраданио дикого типа, которых мы разделили на 2 группы: 1 группа – АК (острая - 125 мг/л, хроническая 5 мг/л), 2 группа - контроль. В остром эксперименте перед тестированием рыб подвергали предварительному воздействию в 0,25-литровом пластиковом стакане в течение 20 минут либо обработанного лекарством, либо не содержащего лекарства носителя. В хроническом рыбы выдерживались 7 дней в растворе вещества или не содержащего лекарства. АК растворяли в 1 мл раствора диметилсульфоксида (1 мл этого раствора также добавляли в контрольную группу). Новый аквариумный тест использовался для оценки поведения зебраданио в течение 5 минут. Поведенческие данные в НТТ анализировали с помощью Noldus EthoVision XT11.5. Статистические данные были рассчитаны с использованием теста Крускала-Уоллиса (KW) с последующим апостериорным тестом Данна для значимых данных KW. Статистическая значимость между рассматриваемыми параметрами была установлена на уровне $P < 0,05$ во всех тестах.

У рыбы, подвергшихся острой воздействию ацетилсалициловой кислоты, наблюдается меньшее количество плаваний в верхней части аквариума ($p < 0.01$)



и меньшее расстояние ($p < 0.01$) по сравнению с контрольной группой. У рыб в хронической дозе - наоборот, высокая частота и продолжительность ($p < 0.01$) пребывания в верхней части аквариума и более высокое значение пройденного расстояния ($p < 0.01$). Таким образом, хроническое воздействие препарата, по сравнению с острой вызвал анксиолитическое поведение. Полученные различия могут быть следствием того, что АК способен ингибировать как провоспалительную ЦОГ-2, так ЦОГ-1 в зависимости от дозы и продолжительности воздействия.

*Работа выполнена при поддержке государственного задания СПбГУ
(Pure ID 93020614).*



AI application to behavioral studies with psychoactive drugs and zebrafish

Galumov G.K.¹, Bozhko D.V.¹, Polovian A.I.¹, Myrov V.O.¹, Kolchanova S.M.¹

1. ZebraML Inc., Houston, TX, USA

Artificial intelligence (AI) is a wide-ranging branch of computer science that builds smart machines to perform tasks typically requiring human intelligence. AI tools are rapidly gaining popularity in biomedical research, for example, enabling fast and reliable diagnostics of cancers from magnetic tomography images and neurological disorders from neuroimaging data. As fully automated tools, AI algorithms work with large amounts of data, especially when it is time-consuming or impossible to analyze and dissect them manually.

Drug researchers are overwhelmed with experimental data obtained during preclinical drug trials such as video recording. The goal of this experiment is to estimate behavioral effects of a drug (seizures, depression etc) using data about animal movements.

Interpretation of hundreds of hours of such videos is difficult and time-consuming and it becomes even more complicated to compare behavioral effects of two different drugs. In the pilot study our company made in the collaboration with the Translational Biomedicine Institute we first trained a neural network to recognize various drugs from a wide range of psychotropic agents tested, and then confirmed prediction accuracy of the trained model by comparing several agents with known similar behavioral and pharmacological profiles.

The key advantages of our approach is data agnosticism, reproducibility and scalability. We work with industry-standard software and train our models with the data provided by a laboratory. We need only 1 hour to process the data from 500+ hours of experimental videos. It doesn't matter where we run our software - in the customer's laboratory (in-house) or in the public cloud. We obtain automatically generated reports based on the needs of customers.

We already used our approach in the study with the novel N-benzyl-2-phenylethylamines and linked the observed in-vivo effects with MDMA and assumed that the potential complex hallucinogenic-like effects may involve both monoaminergic and glutamatergic modulation.



Санкт-Петербургский
государственный
университет



AI analyses offer the advantage of reliably detecting complex changes in locomotion that may otherwise remain obscured during conventional statistical analysis. The usage of AI technology provides a point of reference for future researchers wishing to conduct high-throughput zebrafish drug experimentation.



Роль неструктурированных участков дрожжевого белка Sup35 в ответе на гиперосмотический шок

Горшенева Н.А.¹, Гризель А.В.², Рубель А.А.¹, Чернов Ю.О.²

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

2. School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

Биомолекулярные конденсаты (биоконденсаты) – немембранные органеллы клетки, представляющие собой скопления определенных белков и часто нуклеиновых кислот. Скопление белков, выполняющих одну и ту же функцию, способствует высокой скорости и точности протекания химических реакций. Чувствительность к небольшим изменениям параметров внешней среды (температуры, рН, осмотического давления), высокая скорость и обратимость образования биоконденсатов позволяет клетке своевременно реагировать на внешние воздействия (образование стресс-гранул, кластеров сигнальных рецепторов на мембране, комплексов репарации ДНК). Несмотря на растущий интерес к изучению немембранных органелл клетки, механизмы их формирования недостаточно изучены.

Удобной моделью для изучения образования биоконденсатов является дрожжевой белок Sup35. В клетках дрожжей Sup35 преимущественно находится в растворимом состоянии и является фактором терминации трансляции eRF3. Неструктурированные NM-домены Sup35 (Sup35NM) участвуют в образовании нерастворимых белковых амилоидных агрегатов Sup35 – приона [*PSI*⁺], что приводит к нарушению распознавания стоп-кодона. Недавно было показано, что Sup35NM также задействован в образовании биоконденсатов в ответ на стрессовые воздействия, сопровождающиеся снижением цитоплазматического рН, однако детальный механизм их образования на данный момент остается неясным.

Цель данной работы – выявить роль отдельных участков NM-доменов Sup35 в образовании биоконденсатов. Для этого варианты белка Sup35, содержащие различные делеции в N-домене, были слиты с флуоресцентным белком YFP и сверхпродуцированы в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Затем была исследована их способность образовывать биоконденсаты без стрессовых воздействий и под действием



гиперосмотического шока (1М KCl). Данные об образовании биоконденсатов были сопоставлены с информацией о количестве исследуемых белков.

Данные эпифлуоресцентной и конфокальной микроскопии показали, что Sup35NM отвечает на гиперосмотический шок образованием биоконденсатов, которые являются жидкими каплями. Согласно результатам делеционного анализа, практически весь N-домен задействован в образовании биоконденсатов, при этом нельзя выделить в нем отдельный участок, отвечающий за конденсацию. Измерения цитоплазматического рН при гиперосмотическом шоке (1М KCl) показали, что механизм образования биоконденсатов при гиперосмотическом шоке не является рН-зависимым.

Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ ID 93025998, а также за счёт средств гранта РФФ № 20-14-00148.

Для выполнения исследований использовали приборные базы РЦ «ХРОМАС» и РЦ «РМиКТ» научного парка СПбГУ.



Новые исследования по моделированию заболеваний мозга на зебраданио

Демин К.А.^{1,2}, Галстян Д.С.¹, Кротова Н.А.^{1,2}, Ильин Н.П.^{1,2}, Державина К.А.²,
Неруш М.О.², Захарченко К.В.², Калуев А.В.^{1,2}

1. Институт Трансляционной Биомедицины, СПбГУ, Россия

2. Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова, Россия

Danio rerio – это относительно новый эффективный модельный организм для нейробиологических, трансляционных и биомедицинских исследований. Данный модельный организм обладает выраженным сходством с млекопитающими, в частности обладая схожим устройством нервной системы с точки зрения нейроанатомии и нейрохимии, а также высокой генетической гомологией ключевых генов ЦНС. Сегодня зебраданио активно используется как модель, способная дополнить существующие представления о патологии позвоночных животных. Но, несмотря на растущую популярность, методологически, а также фундаментально, многие концепты использования данного организма для трансляционных исследований остаются неизученными и неразработанными. За последние годы модели на зебраданио существенно дополнили наше представление об эффектах психоактивных препаратов и позволили существенно продвинуть разработку методов визуализации мозга. В данной работе освещены последние наработки, связанные с использованием зебраданио в нейробиологическом моделировании, в том числе связанные с нейрофенотипированием и патофизиологическими исследованиями. Обсуждаются также возможные пути дальнейшего развития отрасли и потенциал использования *Danio rerio*.

*Работа выполнена при поддержке государственного задания СПбГУ
(Pure ID 93020614).*



Физиологические функции рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами

Ефимова Е.В.¹, Католикова Н.В.¹, Меркульева Н.С.², Вещицкий А.В.²,
Гайнетдинов Р.Р.¹

1. Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

2. Лаборатория нейроморфологии, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

Следовые амины представляют собой новую систему нейромедиаторов в головном мозге, которая в последние несколько лет вызвала большой интерес. Открытие рецепторов ассоциированных со следовыми аминами (TAAR) проложило путь к пониманию функций следовых аминов в физиологии и фармакологии. До этого TAAR5 рецепторы считались в основном обонятельными и о их влиянии на физиологию работы головного мозга не было данных.

В нашей работе по оценке функции TAAR5 рецептора, мы изучали изменения в поведении, нейрохимии головного мозга, экспрессии белков головного мозга и количество нейронов у животных с нокаутом TAAR5. Во всех экспериментах животных с нокаутом сравнивали с животными дикого типа.

Мы провели исследование поведения в тестах открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, принудительное плавание, чтобы оценить возможные изменения в поведении нокаутов TAAR5. В тесте «открытое поле» у нокаутных животных двигательная активность не изменилась. В тест приподнятый крестообразный лабиринт животные проводили значительно больше времени на открытых лучах, что свидетельствует о снижении уровня тревожности. В тесте принудительного плавания по Порсолту у нокаутированных животных значительно снизился уровень иммобилизации, что свидетельствует о более низком уровне депрессивноподобного поведения.

Мы измеряли уровни моноаминов в ткани головного мозга различных структур головного мозга (стриатум, префронтальная кора, гипоталамус, гиппокамп, обонятельная луковица) с помощью ВЭЖХ с элетрохимической



детекцией. У животных с нокаутом TAAR5 был значительно повышен уровень дофамина в стриатуме.

Для дальнейшего изучения состояния дофаминовой системы мы провели иммуногистохимию и подсчитали количество тирозингидроксилазоположительных нейронов в черной субстанции. Животные с нокаутом TAAR5 имели значительно большее количество TH-позитивных нейронов в Sub. Nigra по сравнению с диким типом.

Мы также измерили уровни экспрессии белков дофаминовой системы в стволе мозга и в коре. Нокаутные животные имели повышенный уровень экспрессии тирозингидроксилазы в стволе головного мозга.

Отсутствие TAAR5 приводило к изменению поведения, снижению уровня тревожности и депрессивному поведению. У животных с нокаутом TAAR5 были изменения в дофаминовой системе, включая уровень дофамина, количество дофаминовых нейронов и уровень тирозингидроксилазы. Наши результаты показывают, что система следовых аминов может влиять на функцию мозга путем модуляции работы дофаминовой системы.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-75-30008.



Enhanced aggressive phenotype and changes in 5-HT regulation in the frontal cortex in TAAR1 knockout mice

I. S. Zhukov^{1,2}, I. V. Karpova², I. Y. Tissen², P.D. Shabanov², R. R. Gainetdinov^{1,3}

1. *Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7-9, 199034 Saint Petersburg, Russia*
2. *Institute of Experimental Medicine, Acad. Pavlov str. 12, 197376 Saint Petersburg, Russia*
3. *Saint Petersburg State University Hospital, Saint Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7-9, 199034 Saint Petersburg, Russia*

Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) is one of the six functional receptors from the family of monoamine-related G protein-coupled receptors (TAAR1-9) found in humans. There are still enough undiscovered biological mechanisms of TAAR1 action in the central nervous system and periphery. In previous investigations, it was shown that the TAAR1 receptor is widely expressed in the prefrontal cortex and several limbic brain regions. Moreover, TAAR1 is involved in interplay with dopamine systems via the TAAR1/D2R heteromer complex, which plays a significant role in limbic brain functions and putative reward circuitry. Recent clinical trials reveal great potential of TAAR1 agonists as principally new antipsychotic treatments for schizophrenia.

Despite the absence of straight evidence between schizophrenia and aggressive behavior, patients with schizophrenia demonstrate an increased tendency toward violent behaviors. Interestingly, D1 and D2 receptors in the ventral striatum are involved in the rewarding properties of aggression, but D1-like is characterized by an accent on motivation to earn reinforcement as opposed to aggressive behavior. On the other side, the D2 receptor is mostly associated with an impulsive aggression phenotype. As a result, a lack of the TAAR1 receptor can potentially affect aggressive behavior in mice. No studies in that field were performed so far. Comparative analysis of TAAR1-KO and WT mice for aggressive behaviors may reveal potential pharmacological perspectives of TAAR1-based drugs in the context of aggressive behavior treatment.

Preliminary results of these studies demonstrate significant changes in the levels of aggression and monoamine tissue content in the frontal cortex. “Resident-



intruder” and "tube test" revealed that the mice with TAAR1 gene knockout demonstrate dominant social behavior. Results of the TAAR1-KO group demonstrate reduced time of the first attack; increased total time spent in battle, and reduced research activity. In general, the TAAR1-KO resident demonstrates attacking behavior, meanwhile, WT group only defends in the episode of a conflict. Neurochemical analysis revealed that TAAR1-KO mice demonstrate significantly increased tissue levels of serotonin in the cortex and decreased levels of the HVA/DA ratio. These observations indicate that future TAAR1-based therapies have great potential in the treatment of aggressive manifestations of neuropsychiatric disorders.

This study was supported by the project ID: 93018770 of the St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia by the Russian Science Foundation



Оценка амилоидогенного потенциала белков человека, предсказанных *in silico*, при помощи дрожжевой тест-системы

Зелинский А.А.¹, Рябина М.В.¹, Козлова А.В.¹, Солодухина У.Н.¹,
Каява А.В.², Чернов Ю.О.³, Рубель А.А.¹

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

2. Centre de Recherche en Biologie cellulaire de Montpellier, Université Montpellier, Montpellier, France

3. School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

Самовоспроизводящиеся белковые агрегаты фибриллярной природы (амилоиды) связаны с целым рядом заболеваний животных и человека. Некоторые амилоиды (прионы) способны передаваться между тканями, органами и даже организмами, обладая, таким образом, инфекционными свойствами. Однако, существуют примеры прионов и амилоидов, для которых характерна положительная биологическая роль. Например, у дрожжей и других грибов прионы могут контролировать наследуемые признаки. В последнее время накапливается всё больше данных о существовании функциональных амилоидов и у высших эукариот.

На данный момент существует масса методов для анализа амилоидогенных свойств белков *in silico*. Эти методы довольно просты в использовании, однако их эффективность требует дальнейшей проверки *in vivo* и *in vitro*.

В нашей работе мы применили биоинформатический алгоритм ArchCandy, способный выявлять возможность формирования β -арок (структур, специфических для амилоидных белков), для поиска амилоидогенных белков человека. По результатам анализа было отобрано 57 белков. Для проверки амилоидогенного потенциала данных белков *in vivo*, была использована, разработанная в нашей лаборатории дрожжевая тест-система, которая по фенотипу рост-отсутствие роста на селективной среде, позволяет проводить скрининг потенциально амилоидогенных белков. В анализ были взяты девять белков с наибольшим предсказанным амилоидогенным потенциалом, а также девять белков, для которых ArchCandy амилоидогенность не предсказывал. Было установлено, что как в опыте, так и в контроле 6 из 9 белков демонстрировали амилоидогенные свойства в дрожжевой модели. В настоящий момент проводится проверка достоверности полученных результатов *in vitro* и



in vivo. Для отдельных белков, амилоидные свойства которых показаны несколькими методами, проводится анализ с использованием методов просвечивающей электронной микроскопии, биохимии и биофизики.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 20-14-00148.

Для выполнения исследований использовали приборные базы РЦ «ХРОМАС» и РЦ «РМиКТ» научного парка СПбГУ.



Изучение совместного влияния мутаций в пептиде A β ₄₂ при помощи дрожжевой модели

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

1. Лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

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

Болезнь Альцгеймера (БА) – наиболее распространенная причина старческой деменции – на которую приходится 80-90% всех случаев. Значительный объём накопленной к настоящему времени информации убедительно показывает, что пусковым механизмом БА является формирование мультимеров пептида A β . Наиболее амилоидогенным вариантом A β является пептид из 42 аминокислотных остатков (A β ₄₂). Нами было произведено исследование амилоидогенного потенциала различных мутантных вариантов пептида A β ₄₂ в системе фенотипической детекции на основе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и выявлены мутации, которые как ослабляют, так и усиливают агрегацию пептида A β ₄₂. Поскольку проявление мутаций в последовательности, кодирующей A β может быть различным в гомо- и гетерозиготном состоянии, мы получили трансформантов дрожжей, несущих по две плазмиды с разными мутантными вариантами A β ₄₂-и исследовали совместное влияние вариантов A β ₄₂ в дрожжевой системе. В ходе проведённого анализа было показано, что варианты A β ₄₂, несущие мутации, снижающие способность к агрегации, могут частично блокировать агрегацию пептида A β ₄₂ дикого типа при совместной продукции в клетках дрожжей. Также был выявлен мутантный вариант A β ₄₂, который сохранял способность к агрегации вне зависимости от совместно продуцирующегося с ним варианта A β ₄₂. Результаты, полученные в данной работе, в дальнейшем будут использованы при моделировании структуры амилоидных агрегатов A β ₄₂, формируемых *in vivo*, а также в перспективе могут помочь при разработке препаратов направленного действия, ингибирующих агрегацию пептида A β ₄₂.

Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ ID 93025998, а также за счёт средств гранта РФФ № 20-14-00148.



Санкт-Петербургский
государственный
университет



*Для выполнения исследований использовалась приборная база РЦ
«ХРОМАС» и «РМиКТ» научного парка СПбГУ.*



Поведенческие эффекты комбинированной отмены алкоголя и никотина у зебраданио

Ильин Н.П.^{1,2}, Галстян Д.С.¹, Неруш М.О.¹, Захарченко К.В.¹, Калуев А.В.^{1,2}

1. Институт Трансляционной Биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

2. Институт Экспериментальной Медицины, Национальный Медицинский Исследовательский центра им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Алкоголь и никотин являются одними из наиболее популярных психоактивных веществ, чрезмерное употребление которых вызывает привыкание и зависимость. Резкое прекращение употребления как алкоголя так и никотина приводит к выраженному синдрому отмены. Ввиду частого совместного употребления данных веществ, крайне распространен феномен алкоголь-никотиновой ко-зависимости – хронические алкоголики часто зависимы от никотина и наоборот. Синдром отмены в таком случае может быть связан как с прекращением употребления одного, так и обоих веществ, что несколько усложняет интерпретацию клинической картины и подбор правильной терапии. Одной из стратегий изучения механизмов синдрома отмены при алкоголь-никотиновой ко-зависимости является создание адекватных моделей на животных. Зебраданио (*Danio rerio*) – относительно новый модельный объект в нейробиологии, быстро набирающий популярность в сфере моделирования синдромов отмены. В частности, для зебраданио была показана способность формировать выраженные поведенческие фенотипы на фоне отмены как алкоголя, так и никотина. В данном исследовании мы показали, как после хронического совместного воздействия алкоголя и никотина отмена каждого из этих веществ будет влиять на поведение зебраданио.

С целью моделирования синдрома отмены рыб в течение 7 дней содержали в растворе этилового спирта и никотина. Начальную концентрацию этанола (0,25%) повышали на 0,1% каждые два дня (0,65% на 7 день), чтобы избежать возникновения толерантности к препарату. Концентрацию никотина также увеличивали градуально в течение недели, начиная с 0,29 мг на 1 л жидкости, заканчивая 1,14 мг/л на седьмой день. По прошествии семи дней рыб разделили на группы “без отмены”, “отмена алкоголя и никотина”, “отмена только никотина”, “отмена только алкоголя”; после чего поведение рыб из каждой группы, а также контрольных рыб, оценивали в тесте нового аквариума. Затем,



в течение одного дня рыбы из соответствующих групп содержались в воде без алкоголя и/или никотина (отмена), после чего поведенческое тестирование проводилось снова. Значения поведенческих параметров были получены путем анализа видеозаписей поведения рыб в ТНА в программе Noldus Ethovision.

Семидневное хроническое воздействие алкоголя и никотина оказало влияние на поведение зебр аданио, значительно увеличив число переходов между зонами (верхней и нижней), при этом не изменив среднее время пребывания в каждой из зон. После отмены алкоголя и/или никотина статистически значимые отличия были выявлены лишь для группы отмены алкоголя – рыбы из этой группы (в сравнении с контрольной группой) проводили значительно больше времени в нижней части аквариума, что принято интерпретировать как проявление тревожности. Интересно, что одновременная отмена алкоголя и никотина, а также отмена никотина на фоне продолжения воздействия этанола не оказали значимого влияния на поведение рыб.

В целом, наше исследование в первый раз показало как хроническое комбинирование воздействие алкоголя и никотина, а также отмена каждого из этих веществ влияет на поведение зебр аданио. Ввиду того, что механизмы фармакологического взаимодействия этанола и никотина не вполне ясны, интерпретация наблюдаемых поведенческих изменений является непростой задачей и требует дальнейших исследований.

*Работа выполнена при поддержке государственного задания СПбГУ
(Pure ID 93020614).*



Роль Na^+ , K^+ -АТФазы и РКС в регуляции жизнеспособности дифференцированной и недифференцированной культуры нейробластомы SH-SY5Y

Казанская Р.Б.^{1,2}, Лопачев А.В.^{1,3}, Тимошина Ю.А.^{1,4}, Бирюкова И.В.⁵,
Абаимов Д.А.¹, Вольнова А.Б.², Федорова Т.Н.¹, Гайнетдинов Р.Р.³

1. Лаборатория экспериментальной и трансляционной нейробиологии, ФГБНУ НЦН, Москва, Россия

2. Биологический факультет, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

3. Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, ИТБМ СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

4. Биологический факультет, МГУ, Москва, Россия

5. ООО «КОРТЭК», Москва, Россия

Известно, что кардиотонические стероиды (КТС), специфические ингибиторы Na^+ , K^+ -АТФазы, в разной степени токсичны для опухолевых клеток. Однако, механизмы лежащие в основе их дифференциальной токсичности для опухолевых и дифференцированных клеток остаются плохо изученными.

В данной работе были исследованы механизмы токсичности КТС на дифференцированной и недифференцированной культуре нейробластомы SH-SY5Y.

Было показано, что убаин, дигоксин и буфалин токсичны как для недифференцированной так и дифференцированной культуры в концентрациях 10–100 нМ. Токсичная концентрация дигоксина составила 100 нМ, в то время как токсичная концентрация буфалина составила 10 нМ. При этом, убаин оказался на порядок более токсичным для недифференцированных клеток (10 нМ), нежели чем для дифференцированных (100 нМ). 10 нМ убаин не вызывал уменьшения активности Na^+ , K^+ -АТФазы при 30 мин инкубации культуры. Также было показано, что дифференцирование культуры SH-SY5Y при помощи ретиноевой кислоты вызывает значительное увеличение выброса дофамина клетками во внеклеточную среду. В тоже время, убаин вызывал снижение уровня дофамина во внеклеточной среде как дифференцированной так и недифференцированной культуры. Токсичность убаина для недифференцированной культуры сопровождается понижением количества анти-апоптотического белка Bcl-2. Также было обнаружено что токсичность



уабаина для недифференцированной культуры SH-SY5Y связана с активностью РКС, так как добавление ингибитора РКС хелеритрина нивелировало токсичность 10 нМ уабаина.

В совокупности, наши данные свидетельствуют о том, что разные КТС могут быть токсичны для дифференцированной и недифференцированной культуры SH-SY5Y в разных концентрациях, а их токсичность связана не с ингибированием насосной функции Na^+, K^+ -АТФазы, а с активацией внутриклеточных сигнальных каскадов.

*This research was funded by the Russian Science Foundation,
grant number 22-75-10131.*



Изменение постуральных реакций в условиях нормального и измененного дофаминергического контроля

Калинина Д.С.^{1,2,3}, Горский О.В.^{1,4}, Сысоев Ю.И.^{1,4}, Попов А.А.⁴, Мусиенко П.Е.^{1,3,4}

1. Лаборатория нейропротезов, Институт трансляционной биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия;

2. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

3. Научно-технический университет Сириус, Сочи, Россия;

4. ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Дофаминергическая модуляция необходима для бессознательного контроля мышечного тонуса, поддержания позы, мимики и пластичности при различных формах локомоторного поведения. Нарушение дофаминергической системы приводит к снижению двигательной активности, снижению скорости моторных реакций, состоянию скованности и гипертонусу мышц. Ключевым регулятором активности дофамина (DA) является транспортер DA (DAT), который контролирует уровень внеклеточного DA в синаптической щели, транспортируя его обратно в нейроны. Ранее было показано, что введение ингибитора тирозингидроксилазы α -метил-р-тирозина (AMPT) приводит к нарушению инициации движения и акинезии у DAT-КО крыс и мышей, однако изменение позных характеристик не были описаны.

Для исследования дофаминергического контроля постуральной функции использовали крыс с нокаутом гена, кодирующего DAT (DAT-КО, $n = 3$) и WT ($n = 3$). Оценка позы проводилась в трех условиях: нормальный уровень DA (WT), умеренный дефицит DA (WT после инъекции 250 мг/кг AMPT) и почти полное отсутствие DA (DAT-КО после 250 мг / кг AMPT). Измерения проводились при спокойном стоянии, для чего на кожу крыс были нанесены маркерные точки нетоксичным красителем в центре таза, на холке и больших вертелах бедренной кости билатерально.

Конфигурация положения тела у крыс с почти полным отсутствием дофамина значительно отличалась. Отношение расстояния между пятками к ширине бедер достоверно различалось между группами и в группе DAT-КО+AMPT было выше, чем в группах WT и WT+AMPT, что означает, что эта группа ставит задние конечности шире. Также об этом свидетельствуют меньшие значения отношения высоты таза к расстоянию до пяток у крыс DAT-



КО+АМРТ, что согласуется с данными, наблюдаемыми у крыс с истощением дофаминергических клеток и у людей с Болезнью Паркинсона. Росто-каудальный наклон туловища у крыс всех трех групп не различался, однако отмечена тенденция более низкому положению таза у крыс DAT-КО+АМРТ, что, по-видимому, связано с изменением тонуса экстензоров. Ранее было показано, что у крыс и у людей с дефицитом дофамина экстензорная активность более подвержена изменениям. Таким образом, можно заключить, что данная модель истощения DA может быть использована для изучения механизмов контроля DA при различных сенсомоторных формах поведения.

*Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ
МК-2765.2021.1.4.*



In vitro фармакология в поиске лигандов TAAR5

Канов Е.В.¹, Гайнетдинов Р.Р.¹

1. Институт трансляционной биомедицины (ИТБМ), Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.

Рецептор следовых аминов, тип 5 (TAAR5) является связанным с G-белком рецептором (GPCR) и принадлежит семейству TAAR (TAAR1-9 у человека). TAAR5 экспрессируется в обонятельном эпителии и, в частности, участвует в восприятии запаха триметиламина. При этом он не взаимодействует с «классическими» следовыми аминами, такими как бета-фенилэтиламин и тирамин. Этот рецептор также присутствует в центральной нервной системе, например, в лимбических регионах, где, возможно, вовлечён в регуляцию эмоций. Известно, что нокаутные по гену TAAR5 мыши характеризуются пониженной тревожностью. Следовательно, антагонисты данного рецептора могут оказаться мощными анксиолитиками и антидепрессантами.

В лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии ИТБМ в качестве первого этапа поиска новых лигандов TAAR используется *in vitro* тестирование с применением различных репортёрных систем. Все эти подходы предусматривают трансфекцию и ко-трансфекцию клеточных линий-«хозяев» геном рецептора и геном-«репортёром».

Метод BRET (резонансный перенос энергии биолюминесценции), основанный на изменениях волновых характеристик люминесценции цАМФ-чувствительного элемента — ЕРАС, широко применяется в качестве показателя активации GPCR, ведущей к повышению внутриклеточной концентрации цАМФ. В частности, данный метод является основным для поиска лигандов TAAR1.

Однако активация TAAR5 может приводить к запуску и других внутриклеточных сигнальных путей, в частности мобилизации внутриклеточного кальция и активации белка β -арестина. Для оценки таких явлений в нашей лаборатории используется нагрузка клеток-«хозяев» специфическим красителем Fura-2 AM, меняющим при связывании кальция волновые характеристики своей флуоресценции, или же трансфекция кДНК белка CASE-12, меняющего при связывании кальция интенсивность своей флуоресценции (т.н. «кальциевый сенсор»). Вовлечение бета-арестина



изучается при помощи коммерческой репортёрной системы PathHunter eXpress[®] CHO-K1 beta_Arrestin hTAAR5 Orphan GPCR Assay (DiscoverX). Система представляет собой стабильно ко-экспрессированные в клетках CHO-K1 человеческий TAAR5 и белок β -аррестин, присоединяющийся к активированному рецептору. И рецептор, и β -аррестин существуют в виде «слитых» с фрагментом β -галактозидазы белков. Присоединение β -аррестина к активированному TAAR5 приводит к образованию полностью функционального фермента, окисляющего люминесцентный субстрат. Интенсивность люминесценции служит, таким образом, показателем активации рецептора.

Следовательно, очерченный круг методов позволяет нашей лаборатории осуществлять поиск лигандов TAAR5, активирующих различные внутриклеточные сигнальные пути. В докладе продемонстрировано использование указанных подходов для *in vitro* оценки агонистического и антагонистического действия разнообразных соединений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-30008.



Оценка уровня экспрессии рецепторов следовых аминов в гиппокампе мышы и человека

Католикова Н. В.¹, Ваганова А.Н.¹, Ефимова Е. В.¹, Гайнетдинов Р.Р.¹

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

Процесс образования нейронов активно идет в эмбриональном периоде развития, однако он также продолжается постнатально и у мыши и у человека. Во взрослом возрасте нейрогенез происходит в так называемых нейрогенных нишах, одной из которых является субгранулярная зона гиппокампа. Этот процесс сложен и регулируется с помощью большого числа систем и факторов. Следовые амины, как нейромедитаторы, были известны давно, а вот рецепторы к ним (trace amine-associated receptors (TAARs)) были впервые описаны только в 2001 г. По своей структуре и функциям TAARs относятся к семейству рецепторов, связанных с G-белком. Большинство из них (TAAR2-TAAR9) в первую очередь считались обонятельными рецепторами. Однако недавние исследования показали, что они также экспрессируются в головном мозге, особенно в лимбических образованиях, и играют роль в регуляции эмоционального поведения, внимания, регуляции движения, а также питания. На мышах, нокатуных по TAARs, было показано, что по крайней мере два члена семейства, TAAR2 и TAAR5, могут оказывать влияние на регуляцию нейрогенеза. В настоящем исследовании мы проанализировали экспрессию всех TAAR в гиппокампе мышы и человека, используя общедоступные наборы данных RNAseq. Наши результаты указывают на спорадическую и случайную экспрессию TAAR в выбранных наборах транскриптомных данных, имеющих большую глубину прочтения. В образцах, полученных от мышы, экспрессия TAAR1, TAAR2, TAAR3, TAAR4 и TAAR5 более выражена, чем экспрессия других TAARs. Напротив, в образцах, полученных от человека, экспрессия TAAR6 была самой высокой. Таким образом, мы можем сделать вывод, что экспрессия некоторых TAARs на низком уровне может быть обнаружена в нейрогенных зонах, в частности, в гиппокампе, а их потенциальная роль в нейрогенезе, а также во время дифференцировки нейронов требует дальнейшего исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (проект № 21-75-20062).



Изучение амилоидных свойств белка РНСЗ человека

Качкин Д. В.¹, Зелинский А. А.¹, Куличихин К. Ю.¹, Хорольская Ю. И.², Рубель А. А.¹, Чернов Ю. О.³

1. Научная лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
2. Центр клеточных технологий, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
3. School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

Амилоидами называют особые агрегаты, обладающие фибриллярной структурой и формирующиеся за счёт образования упорядоченных межмолекулярных кросс-бета слоев. Скопления амилоидов в тканях ассоциированы с рядом неизлечимых заболеваний млекопитающих. К таким патологиям относятся болезни Альцгеймера, Паркинсона, диабет второго типа, прионные заболевания и многие другие неизлечимые заболевания. Наряду с патогенными амилоидными белками, в природе выявлены и функциональные амилоиды, выполняющие важные биологические функции, такие как регуляция долговременной памяти у животных, катализ полимеризации меланина у млекопитающих, хранение пептидных гормонов, формирование биоплёнок у бактерий и прочие функции.

Благодаря биоинформатическому алгоритму ArchCandy, разработанному в лаборатории А.В. Каявы, был произведен масштабный поиск белков, обладающих потенциалом к образованию амилоидных структур. На основании полученных данных было предсказано существование ряда новых амилоидогенных белков человека. Одним из белков-кандидатов стала изоформа 5 белка РНСЗ человека, полноразмерная изоформа которого входит в состав поликомб репрессивного комплекса 1 (PRC1).

Интерес к белку РНСЗ вызван не только его высоким потенциалом к образованию β -арок (структура, характерная для амилоидных белков), но и его функциональной значимостью в регуляции транскрипции. При переходе мономерного белка в амилоидную конформацию он, как правило, теряет свою функцию. В связи с этим особенно актуальным представляется изучение и определение функциональной значимости амилоидной конверсии белка РНСЗ.

В данной работе мы использовали различные методы проверки амилоидных свойств белка РНСЗ человека в условиях *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*.



В результате данной работы подтверждена способность укороченных изоформ белка человека РНС3 формировать амилоидоподобные агрегаты при сверхпродукции в клетках дрожжей и человека. Амилоидные свойства белка РНС3 подтверждены *in vitro*. Основываясь на полученных данных, сформулирована гипотеза регуляции экспрессии генов укороченными изоформами РНС3 (5 и 6) по механизму амилоидной агрегации.

*Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ (Pure ID: 93025998)
и гранта РФФ № 20-14-00148.*



Оценка амилоидогенных свойств трансмембранных белков человека

Козлова А.В.¹, Зелинский А.А.¹, Рябинина М.В.¹, Солодухина У.Н.¹, Бондарев С.А.^{1,2}, Чернов Ю.О.³, Рубель А.А.^{1,2}

1. Лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

2. Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

3. School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, USA

Отложение амилоидов является ключевым событием в патогенезе ряда заболеваний человека и животных, называемых амилоидозами. Наиболее известными амилоидозами являются болезнь Альцгеймера, хорея Хантингтона, диабет II типа. Кроме патогенных амилоидов известны и функциональные, участвующие в важных биологических процессах [1]. Предполагается, что разнообразие амилоидов и амилоидогенных белков значительно больше, чем известно на сегодняшний день [1].

В ходе данной работы была проведена оценка способности к амилоидной агрегации четырех трансмембранных белков человека, отобранных по результатам предсказания при помощи биоинформатического алгоритма ArchCandy-1.0 [2]. Ранее оценка способности трансмембранных белков человека к агрегации не проводилась.

Используя алгоритм ArchCandy, мы проанализировали 5193 трансмембранных белка. Пороговое значение суммарного счета для поиска кандидатов соответствовало 0,575. Последовательности, для которых показатель превышал пороговое значение, рассматривались как потенциально амилоидогенные. Для 95,26% проанализированных белков, алгоритм ArchCandy предсказывал склонность к формированию β -арок. По результатам анализа *in silico*, были отобраны 4 белка с разными значениями суммарного счета: SCAMP5 (счет = 44,23), STX7 (счет = 9,36), TMX1 (счет = 8,56) и VTI1B (счет = 1,38).

Для проверки амилоидогенного потенциала исследуемых трансмембранных белков *in vivo* была использована дрожжевая модель. Были сконструированы челночные плазмиды кодирующие исследуемые белки, слитые с репортерными последовательностями YFP или Sup35N. Полученные



конструкции были введены методом ДНК-трансформации в клетки дрожжей. Мы подтвердили, что все исследуемые белки человека, слитые с последовательностью YFP, формируют структуры, ко-локализующиеся с мембранами в дрожжевых клетках. В то же время выявлялись скопления белка, которые не ко-локализовались с мембранами и ядром.

Для оценки способности трансмембранных белков к агрегации по амилоидному типу в работе использовали дрожжевых трансформантов продуцирующих исследуемые белки, слитые с последовательностью Sup35N. Амилоидогенный потенциал белков оценивали по способности трансформантов индуцировать прион [PSI^+] [3, 4]. Было установлено, что из исследованных белков амилоидогенный потенциал в дрожжевой тест-системе демонстрирует только белок TMX1. Поскольку одной из особенностей амилоидов является устойчивость к ионным детергентам, мы проанализировали устойчивость скоплений, формируемых трансмембранными белками человека в клетках дрожжей, к действию 3% лаурилсаркозината натрия. Мы показали, что только трансмембранный белок SCAMP5 формирует полимеры устойчивые к действию 3% лаурилсаркозината натрия, тогда как белки TMX1, VTI1B и STX7 устойчивость к детергенту не демонстрировали. На основании полученных данных можно сделать заключение, что белки человека STX7 и VTI1B не обладают амилоидогенным потенциалом. Для оценки амилоидогенного потенциала белков SCAMP5 и TMX1 необходимы дополнительные исследования *in vivo* и *in vitro*. Полученные результаты важны для характеристики используемой в работе дрожжевой тест-системы, а также для оценки предсказательных способностей алгоритма ArchCandy.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №20-14-0014 и за счёт средств гранта Санкт-Петербургского государственного университета проект №93025998.

Для исследований использовали приборную базу ресурсных центров СПбГУ: «ЦКП ХРОМАС», «РМиКТ».

[1] Rubel M. S. et al. Functional mammalian amyloids and amyloid-like proteins //Life. – 2020. – Т. 10. – №. 9. – С. 156.

[2] Ahmed A. B. et al. A structure-based approach to predict predisposition to amyloidosis //Alzheimer's & Dementia. – 2015. – Т. 11. – №. 6. – С. 681-690.



[3] Chandramowlshwaran P. et al. Mammalian amyloidogenic proteins promote prion nucleation in yeast //Journal of Biological Chemistry. – 2018. – Т. 293. – №. 9. – С. 3436-3450.

[4] Chernoff Y. O. et al. Application of yeast to studying amyloid and prion diseases //Advances in genetics. – 2020. – Т. 105. – С. 293-380.



Изменение поведения зебраданио (*Danio rerio*) в результате ранней социальной депривации: пилотное исследование

Кротова Н.А.^{1,2}, Державина К.А.^{1,2}, Серединская М.В.¹, Захарченко К.В.², Демин К.А.^{1,2}, Калуев А.В.^{1,2}

1. Лаборатория биологической психиатрии, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

2. Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение “Научный Медицинский Исследовательский Центр им. В.А. Алмазова”, г. Санкт-Петербург, Россия

Социальное взаимодействие важно для поддержания здоровья как психического, так и физического. Нарушение социального взаимодействия и его отсутствие связаны с повышением риска развития заболеваний. Для изучения влияния социальной депривации могут быть использованы зебраданио в связи с хорошо охарактеризованными фенотипами социального поведения и высокой гомологией с человеческим организмом. Социальное поведение зебраданио начинает формироваться с 7 по 21 день после оплодотворения. Изменение условий социального взаимодействия в этот критически важный период дает возможность понять, как изменяется поведение рыб.

Для эксперимента были выведены мальки дикого типа, которых на 10 день с момента получения икры разделили на две группы: контроль и социальная изоляция. В течение 23 дней было проведено 6 циклов социальной депривации по схеме: 3 дня рыбы находились в индивидуальных аквариумах и на 4 день помещались в общий аквариум. На 24 день для оценки изменения поведения непосредственно после социальной депривации был проведен Тест Нового Аквариума (5 минут). Затем на 91 день Тест Нового Аквариума был проведен повторно. Для оценки изменения поведения использовалась программа EthoVision ХТ. На 100 день был проведен Тест Построения Косяка (10 минут). Оценка косяка осуществлялась каждые 5 секунд с использованием ImageJ. Для статистического анализа применялся дескриптивный анализ и U-критерий Манна-Уитни.

Первый Тест Нового Аквариума показал, что у рыб из группы социальной изоляции была меньшая скорость перемещения, относительно контроля. Отмечались беспорядочные эрратические движения, а также экспериментальная группа чаще оказывалась в нижней части аквариума. При повторении данного



теста наблюдались меньшие различия поведения экспериментальных и контрольных рыб, однако эрратические движения сохранились. В Тесте Построения Косяка рыбы из группы социальной депривации образовывали более плотные косяки, относительно контроля.

Таким образом, ранняя социальная депривация мальков зебр адано приводит к развитию тревожного поведения, о чем говорят результаты Теста Нового Аквариума, и нарушению социального поведения, что отмечалось в Тесте Построения Косяка.

*Работа выполнена при поддержке государственного задания СПбГУ
(Pure ID 93020614).*



Изучение роли рецепторов следовых аминов в терморегуляции

Куварзин С.Р.¹, Ефимова Е.В.¹, Канов Е.В.¹, Муртазина Р.З.¹, Гайнетдинов Р.Р.¹

1. Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

В процессе изучения нокаутных животных по генам TAAR1, TAAR2, TAAR5, TAAR6 и TAAR9 были выявлены различия в температурных ответах на стресс, фармакологические препараты, температуру окружающей среды. Так, у нокаутов по гену TAAR1 стресс-индуцированная гипертермия не купируется TAAR1-агонистами, TAAR5-нокауты имеют повышенный гипотермический ответ на введение 5-HT₁, 5-HT₇ агониста 8-OH-DPAT.

На TAAR6 мутантных животных была также изучена амплитуда и продолжительность гипотермического ответа на введение 5мг/кг 8-OH-DPAT по сравнению с животными дикого типа. Выраженность гипотермии была значительно сильнее у мутантов ($33.2 \pm 0.26^\circ\text{C}$) по сравнению с мышами дикого типа ($35.0 \pm 0.37^\circ\text{C}$) ($p < 0.0001$, Mean \pm SEM one-way ANOVA). Во времени эффект у мутантных животных также был значительно увеличен. В совокупности с нейрохимическими изменениями на основании полученных данных было выдвинуто предположение об изменениях в серотониновом сигналинге, лежащих в основе данного феномена. Однако, стоит также учесть возможность взаимодействия самого рецептора TAAR6 с 8-OH-DPAT, что требует дальнейшего изучения.

Крысам, нокаутным по рецептору TAAR9, и контрольным животным дикого типа, были имплантированы термодатчики, разрешение записи которых составляло 3 минуты. На данных животных проведено предварительное тестирование гипо- и гипертермического воздействия среды, стресса и фармакологических препаратов различных групп. Выявлены различия в температурных ответах между нокаутными животными и животными дикого типа: требуется дальнейшее увеличение количества животных в обеих группах для корректной статистической обработки результатов.

На мышах, нокаутных по гену TAAR2, было исследовано действие температуры окружающей среды и фармакологических агентов. Статистически значимые различия между нокаутными животными и животными дикого типа



на данном этапе работы были выявлены только при воздействии повышенной температуры окружающей среды.

По всей видимости, рецепторы следовых аминов каким-то образом модулируют температурные ответы грызунов на всевозможные раздражители. Так или иначе, различия в температурных ответах выявлены на всех имеющихся нокаутных линиях. Открытым вопросом остаётся трансляция полученных данных, так как механизмы терморегуляции человека и грызунов не совсем идентичны. Однако, по причине сравнительной простоты данного метода изучения нокаутов, малых разбросов в исходных данных, высокой производительности и сравнительной дешевизне оборудования для измерения температуры, стоит задуматься о более разностороннем исследовании терморегуляции на всех нокаутных линиях.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ
в рамках научного проекта № 20-315-90077*

The reported study was funded by RFBR, project number 20-315-90077



Влияние длительного введения гуанфацина на пространственную рабочую память у крыс, нокаутных по гену обратного захвата дофамина.

Курзина Н.П.¹, Бельская А.Д.^{1,2}, Громова А.А.², Вольнова А.Б.^{1,2}, Гайнетдинов Р.Р.^{1,3}

1. Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

2. Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия

3. Клиники высоких медицинских технологий имени Н. И. Пирогова СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Для изучения роли дофамина в развитии различных нейропсихологических заболеваний используется модель крыс, нокаутных по гену обратного захвата дофамина (DAT-KO) крысы. У DAT-KO крыс имеет место выраженная двигательная гиперактивность и когнитивные нарушения. В регуляции когнитивных функций наряду с дофамином принимает участие норэпинефрин. Взаимодействие этих медиаторов в области префронтальной коры во многом определяет целенаправленное поведение животных и человека. Гуанфацин, являясь селективным агонистом $\alpha 2A$ -адренорецепторов, может улучшать функционирование префронтальной коры.

Исследовалось влияние длительного системного введения гуанфацина на пространственную рабочую память у DAT-KO крыс. Было использовано 20 DAT-KO крыс и 20 крыс дикого (WT) типа. Крысы выполняли задачу поиска пищевого подкрепления в лабиринте Хебба-Уильямса. Сравнивались показатели успешности выполнения задачи у DAT-KO и WT крыс. Гуанфацин вводили внутрибрюшинно в дозе 0.25 мг в течение двух недель до начала поведенческого эксперимента и девяти дней во время его проведения.

Обнаружено, что DAT-KO крысы проходили в лабиринте достоверно большее расстояние по сравнению с контрольными животными. Время выполнения задачи так же было достоверно больше у DAT-KO, чем у WT крыс. Введение гуанфацина достоверно увеличивало время выполнения задачи у нокаутных животных по сравнению с введением физиологического раствора. Время нахождения в зонах ошибок достоверно снижалось у DAT-KO крыс после введения гуанфацина, но было больше такового у WT крыс. Количество стереотипных паттернов активности было больше у DAT-KO крыс, чем у WT



крыс, введение гуанфацина не приводило к снижению этого типа моторной активности.

Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии гуанфацина на выполнение сложной поведенческой задачи. В пользу этого говорит снижение времени нахождения в зонах ошибок. Увеличение времени выполнения задачи свидетельствует о снижении гиперактивности, характерной для DAT-KO крыс, и вероятно, отражает улучшение процессов внимания и, как следствие, пространственной рабочей памяти у DAT-KO крыс.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-75-20069.



Исследования нуклеосомной частицы с помощью экспериментов ЯМР и МД моделирования

Лебедеико О.О.¹, Измайлов С.А.¹, Рабдано С.О.¹, Джароняк К.П.²,
Скрынников Н.Р.^{1,3}

1. *Лаборатория биомолекулярного ЯМР, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург 199034, Российская Федерация*
2. *Department of Chemistry and Biochemistry, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA*
3. *Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-2084, USA*

ДНК-белковый комплекс – нуклеосома является фундаментальной единицей упаковки молекулы ДНК в клетках эукариот. Нуклеосома представляет собой октамер белков-гистонов (по 2 молекулы каждого вида гистонов H2A, H2B, H3 и H4), вокруг которого закручено 145-147 пар нуклеотидных оснований ДНК. При этом каждый гистон имеет в своём составе гибкие N- или C-терминальные "хвосты", располагающиеся над поверхностью нуклеосомы и открытые для доступа извне. Именно через гистоновые хвосты осуществляется регуляция различных процессов, в частности регулируется доступность молекулы ДНК для считывания генетической информации. Исчерпывающее понимание молекулярных основ функционирования гистоновых хвостов затруднено в связи с тем, что стандартные экспериментальные методы (например, рентгеноструктурный анализ и электронная микроскопия) непригодны для исследования разупорядоченных сегментов пептидной цепи. Полноценная модель конформационного многообразия разупорядоченных гистоновых хвостов может быть получена в ходе моделирования методом молекулярной динамики (МД). Однако подобные модели требуют тщательной экспериментальной валидации.

В наших предыдущих исследованиях мы охарактеризовали динамические свойства N-концевого хвоста гистона H4 (N-H4), используя для этого длинные (2 μ s) траектории МД в совокупности с данными измерений скоростей ЯМР-релаксации спинов ¹⁵N. Наиболее успешная МД модель была получена в силовом поле ff14SB с использованием воды TIP4P-D. Нам удалось показать, что N-H4 в значительной мере сохраняет высокую подвижность в составе нуклеосомы с замедлением ~ 10 раз по отношению к



свободному пептиду с той же аминокислотной последовательностью. При этом часть из заряженных остатков N-H4 образуют контакты с молекулой ДНК, играя роль своего рода "динамических якорей", а лежащие между ними участки пептидной цепи ведут себя как гибкие петли. В настоящей работе мы сосредоточились на пространственной локализации N-H4 в составе нуклеосомной частицы, опираясь на МД моделирование и экспериментальные данные измерений парамагнитного усиления ядерной релаксации (Paramagnetic relaxation enhancement, PRE). Для этой цели было сконструировано четыре образца нуклеосомы, помеченных нитроксильной меткой MTSL, прикрепляемой к четырём различным остаткам в составе гистона H3 (K36C, L65C, K79C, и Q125C), а также ^{15}N -меченых по остаткам гистона H4. С использованием этих образцов были измерены коэффициенты ослабления для интенсивности спектральных пиков в спектре ($^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N)-HSQC для спектральных сигналов N-H4 в присутствии парамагнитной метки на гистоне H3.

Полученные таким образом значения PRE определяются средним расстоянием от парамагнитной метки до соответствующего протона $^1\text{H}^{\text{N}}$, и тем самым могут служить своеобразным зондом для определения пространственной локализации N-H4. Наряду с экспериментальными данными, нами также были рассчитаны теоретические значения PRE из уже упомянутой выше МД траектории. При расчётах в полной мере учитывалась динамика системы, включая движение разупорядоченного хвоста N-H4 и мобильной парамагнитной метки. Предсказываемые на основе данных МД значения PRE находятся в хорошем качественном согласии с экспериментальными данными, а именно: экстремально высокие значения PRE для образцов K79C-MTSL и L65C-MTSL, умеренные для Q125C-MTSL и низкие для K36C-MTSL. Дальнейший анализ МД траектории показал, что N-H4 преимущественно локализован вблизи поверхности нуклеосомной ДНК, однако сохраняет при этом высокую конформационную подвижность. В совокупности экспериментальные и теоретические результаты косвенным образом подтвердили предположение о динамическом взаимодействии хвоста гистона H4 с нуклеосомной ДНК, которое можно классифицировать как "нечёткое взаимодействие" (fuzzy interaction). Для получения более полного представления о рассматриваемой системе мы планируем внедрить парамагнитную метку в состав нуклеосомной ДНК, а также исследовать поведение гистонового хвоста N-H4 в ответ на модификацию лизиновых и аргининовых остатков.



Санкт-Петербургский
государственный
университет



Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ 92425251.



Протеомные методы в расшифровке механизмов остеогенной дифференцировки

Лобов А.А.¹

1. Лаборатория регенеративной биомедицины, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

Остеогенная дифференцировка заключается в приобретении клетками специализированного фенотипа, в котором они способны секретировать и минерализовать внеклеточный матрикс за счет отложения гидроксиапатита. Способность претерпевать остеогенную дифференцировку – это одна из ключевых особенностей всех мезенхимных стволовых клеток (МСК).

Подавляющее число исследований, посвященных молекулярным механизмам остеогенной дифференцировки, проведены на МСК костного мозга или жировой ткани. При этом, открытым остается вопрос о тканевой специфичности молекулярных механизмов остеогенной дифференцировки. Действительно ли МСК из разных источников могут формировать единый фенотип после остеогенной дифференцировки *in vitro*? Аналогичны ли молекулярные механизмы нормальной остеогенной дифференцировки и эктопической кальцификации?

Для ответа на эти вопросы мы провели серию протеомных исследований первичных культур мезенхимных клеток человека из семи тканевых источников и их секретомов при помощи различных подходов скорострельной протеомики.

Нам удалось выявить значительную тканевую специфичность большинства изученных типов клеток. Три типа МСК зуба, выделенные из связки зуба, пульпы зуба и десны, образуют единый кластер как по их протеомному профилю, так и по составу секретомы. Вероятно, это обусловлено единством происхождения этих клеток. После дифференцировки они кластеризуются вместе с остеобластами.

Другие изученные типы клеток: МСК желе Уортона, МСК жировой ткани и интерстициальные клетки аортального клапана сохраняют свою тканевую специфичность как до, так и после остеогенной дифференцировки. Примечательно, что в случае остеобластов переход к кальцификации внеклеточного матрикса требует от них лишь небольшого сдвига протеомного профиля, значительно меньшего чем у остальных типов изученных клеток.



Санкт-Петербургский
государственный
университет



Работа выполнена при поддержке гранта РФФ No 18-14-00152-П.



Изучение роли Na^+, K^+ -АТФазы, кардиотонических стероидов и TAAR1 в регуляции работы дофаминергической системы у мышей линии C57Black

Лопачев А.В.^{1,2}, Казанская Р.Б.^{2,3}, Кравченко М.А.³, Тимошина Ю.А.^{2,4}, Завьялов В.А.³, Вольнова А.Б.³, Федорова Т.Н.², Гайнетдинов Р.Р.¹

- 1. Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, ИТБМ СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия*
- 2. Лаборатория экспериментальной и трансляционной нейрхимии, ФГБНУ НЦН, Москва, Россия*
- 3. Биологический факультет, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия*
- 4. Биологический факультет, МГУ, Москва, Россия*

Кардиотонические стероиды (КТС) связываются с насосной α субъединицей Na^+, K^+ -АТФазы (НКА), обратимо ингибируя ее активность. Ряд исследований свидетельствует о наличии у млекопитающих эндогенных аналогов КТС [1]. Существуют предпосылки того, что эндогенные КТС млекопитающих оказывают влияние на работу дофаминергической системы, что делает актуальным исследование их возможной роли в развитии нейропсихиатрических и неврологических заболеваний. Ранее было показано, что однократное внутрижелудочковое введение убаина вызывает маниеподобное поведение, снижение скорости обратного захвата дофамина из синаптической щели и гиперактивацию дофаминовых рецепторов [2]. Можно также предположить, что помимо дофаминовых рецепторов в реализации эффектов убаина могут участвовать рецепторы, ассоциированные со следами аминами (TAAR). Хотя однократное введение убаина не приводило к гибели нейронов в мозге мышей линии C57Black, было сделано предположение о том, что хроническая гиперактивация дофаминергической системы вследствие многократного введения КТС может приводить к неврологическим нарушениям и гибели нейронов.

Для того, чтобы проверить данное предположение было проведено унилатеральное внутрижелудочковое введение 1,5 мкл 50 мкМ убаина в мозг мышей линии C57Black в течение 14 дней с оценкой двигательной активности и неврологических нарушений до введения, в 1-й день введения, на 5-й день введения, 10-й день введения, 15-й день после введений и 24-й день после введений. Также была построена кривая ингибирования активности НКА



грубой синапсомальной фракции мозга мышей и проведено измерение активности НКА в стволе и стриатуме мозга после однократного введения убаина.

Константы ингибирования Na^+/K^+ -АТФазы убаином в грубой синапсомальной фракции больших полушарий мозга мышей линии C57BL/6 составили $0,25 \pm 0,08 \mu\text{M}$ для $\alpha 2 + \alpha 3$, и $50 \pm 10 \mu\text{M}$ для $\alpha 1$. Доля вклада в общую активность составила $33 \pm 7\%$ для $\alpha 1$ и $67 \pm 7\%$ для $\alpha 2 + \alpha 3$. Через 10 мин после ICV введения убаина увеличивается активность Na^+/K^+ -АТФазы в стриатуме мозга, через 30 мин снижается в стволе и не меняется в гиппокампе и мозжечке мышей линии C57BL/6. Внутривенное хроническое (14 дней) введение убаина мышам линии C57BL/6 приводит к моторным нарушениям при прохождении планки и в степпинг-тесте, а также к гиперлокомоции в открытом поле.

Таким образом, хроническое введение КТС может вызывать долговременные двигательные нарушения. Можно предположить, что механизмы развития данных нарушений включают в себя дисрегуляцию работы дофаминергической системы, в том числе, со стороны TAAR. Однако для проверки данного предположения требуются дальнейшие исследования на животных с нокаутом генов TAAR.

*Работа выполнена при поддержке государственного задания СПбГУ
(ID 93018770).*

1. Bagrov AY, Shapiro II, Fedorova OV. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev.* 2009;61: 9–38.
2. Lopachev A, Volnova A, Evdokimenko A, Abaimov D, Timoshina Y, Kazanskaya R, et al. Intracerebroventricular injection of ouabain causes mania-like behavior in mice through D2 receptor activation. *Sci Rep.* 2019;9: 15627.



Исследование *de novo* сконструированных мини-белков – блокирующих лигандов шиповидного белка вируса SARS-CoV-2

Лузик Д.А.¹, Харьков Б.Б.¹, Бушманова Е.Л.¹, Тюряева И.И.^{1,2}, Лебеденко О.О.¹, Корбан С.А.^{1,3}, Михайловский О.В.¹, Саликов В.А.¹, Левкина А.Д.¹, Ануфриков Ю.А.⁴, Зобнина А.Е.⁵, Подкорытов И.С.¹, Скрынников Н.Р.^{1,6}

1. Лаборатория био-ЯМР, СПбГУ, Санкт-Петербург 199034

2. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург 194064

3. Лаборатория биотехнологии, НИЦ Курчатовский Институт - ПИЯФ, Гатчина 188300

4. Институт Химии, СПбГУ, Санкт-Петербург 198504

5. Лаборатория биологии амилоидов, СПбГУ, Санкт-Петербург 198504

6. Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette IN 47907, USA

Разразившаяся в 2020 году пандемия коронавируса, вызванная вирусом острого респираторного синдрома SARS-CoV2, на сегодняшний день унесла жизни более 6 миллионов человек по всему миру и привела к глобальному экономическому кризису. Разработка способов профилактики и терапии этой смертельно опасной инфекции стала основной темой биомедицинских исследований последних двух лет. В качестве основного средства защиты, составляющего главную "линию обороны", рассматриваются вакцины, однако их эффективность также снижается в результате появления новых штаммов вируса, а попытки создания препаратов для специфической терапии COVID-19 имели весьма ограниченный успех.

Одной из основных стратегий при разработке терапевтических препаратов является блокирование взаимодействия рецептор-связывающего домена шиповидного белка SARS-CoV2 (RBD-S) с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2) человека, считающегося критически важным для проникновения вируса в клетку. В конце 2020 года сотрудниками лаборатории Д. Бейкера была предложена новая схема для создания ингибиторов этого взаимодействия на основе искусственно сконструированных (с использованием программного пакета Rosetta) мини-белков, обладающих высокой связывающей способностью по отношению к RBD-S [Cao *et al.*, *Science* 2020 370:426]. Главными достоинствами таких белковых ингибиторов, с точки зрения авторов, являются высокая эффективность, стабильность, низкая иммуногенность, возможность недорогого крупномасштабного производства в клетках *E.coli*, а также возможность оптимизации мини-белка под новый штамм SARS-CoV2 в течение нескольких недель. *In vivo* исследования на мышах линии K18-



hACE2LCB1 показали, что при использовании в виде назального спрея наиболее эффективные мини-белки способны защищать животных от коронавирусной инфекции на срок до 5 дней [Case *et al.*, *Cell Host Microbe* 2021 29:1151].

В нашей работе мы провели всестороннее исследование семи наиболее перспективных вариантов мини-белков. Для этой цели, методом рекомбинантной экспрессии в клетках *E.coli* нами были получены образцы мини-белков. В дополнение к этому в клетках *P.pastoris* были получены образцы RBD-S дикого типа, а также вариантов Дельта, Дельта+, и Омикрон. Дальнейшее исследование включало в себя оценку структурных характеристик этих белков методами гетероядерного ЯМР и масс-спектрометрии MALDI, оценку их аффинности по отношению к дикому типу RBD-S, а также вариантов Дельта и Дельта+, с помощью изотермической титрационной калориметрии (ИТК) и специально разработанной нами методики иммуноферментного анализа (ИФА), предназначенной для оценки суб-наномольных взаимодействий. Кроме того, нами был изучен механизм удержания мини-белков в 3D-модели эпителиальных клеток RPMI 2650.

В результате этих исследований нами была подтверждена высокая аффинность мини-белков к RBD-S дикого типа и эпидемиологически значимого штамма Дельта, а также способность эффективно блокировать их взаимодействие с человеческим ACE2, было продемонстрировано отсутствие цитотоксичности. Результаты изучения поведения мини-белков в 3D-модели клеток RPMI 2650, имитирующей назальный эпителий человека, позволяют предположить, что мини-белки могут длительно удерживаться в эпителиальной ткани за счет медленного рециклирования. Наконец, с помощью вычислительного протокола Rosetta Flex DDG нами были разработаны оптимизированные версии мини-белков, показывающие высокую аффинность к RBD-S варианта Дельта+, для которого исходные мини-белки оказываются сравнительно неэффективными. Полученные результаты позволяют предположить, что сконструированные с помощью белковой инженерии мини-белки могут эффективно использоваться в качестве профилактического средства в борьбе с инфекцией COVID-19, а также другими вирусными инфекциями.

Мы благодарим Ресурсные центры ВЦ, МРМИ, МАСВ, РМКТ, РДМИ, ТКМИ,



ДФММФН и ОЛМИВ Научного парка СПбГУ за помощь в выполнении этой работы.

Изучение преодоления межвидового прионного барьера на модели [PSI⁺] далеких видов дрожжей

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

1. *Научная лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*
2. *School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA*

Целый ряд неизлечимых смертельных заболеваний млекопитающих связан с неправильной укладкой и агрегацией прионного белка PrP (от Prion Protein). К таким заболеваниям относятся: губчатая энцефалопатия у крупного рогатого скота, скрейпи у овец и заболевания человека такие, как Куру, болезнь Кройцфельда-Якоба и другие. Отличительной особенностью данных заболеваний (называемых прионными) является их инфекционность, то есть способность передаваться от одного организма к другому. Точное воспроизведение структуры агрегата приона оказывается возможным благодаря идентичности взаимодействующих аминокислотных последовательностей. При дивергенции последовательностей, передача прионного состояния в большинстве случаев нарушается, что приводит к межвидовому барьеру при передаче прионов. Однако известно, что в ряде случаев межвидовые прионные барьеры могут преодолеваются механизм межвидового прионного барьера остаётся до конца не ясным.

Изучение взаимодействия прионных белков, имеющих различную степень сходства, удобно производить в дрожжевой модели. Основными преимуществами данной модели является наличие легко детектируемых фенотипов дрожжей, зависящих от наличия прионов, а также сходство механизмов агрегации дрожжевых прионов и прионов млекопитающих. Наиболее хорошо изученным прионом дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* является [PSI⁺] – прионная изоформа белка Sup35. Между Sup35 из филогенетически близких видов дрожжей передача приона [PSI⁺] происходит наиболее эффективно, между более удаленными видами передача прионного состояния затрудняется или становится невозможной, вследствие возникновения межвидового прионного барьера.



В данной работе рассмотрена возможность передача прионного состояния между белками Sup35 из различных видов дрожжей, имеющих различную степень сходства аминокислотных последовательностей. Показана возможность передачи прионного состояния между удаленными видами дрожжей. Изучены закономерности передачи прионного состояния между белками Sup35, имеющими слабую степень родства. Исследовано влияние шаперонов на преодоление межвидовых прионных барьеров.

Работа была выполнена за счёт средств гранта РФФ № 20-14-00148, а также из средств Санкт-Петербургского государственного университета (проект № 93025998).

Для исследований использовали приборную базу ресурсных центров СПбГУ: «ЦКП ХРОМАС», «РМиКТ».



Как и зачем управлять остеогенной дифференцировкой?

Малашичева А.Б.¹

1. Лаборатория регенеративной биомедицины, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

Остеогенная дифференцировка мезенхимных стволовых клеток - это многоступенчатый процесс, протекающий сходным образом в норме при развитии костной ткани, и при патологиях таких, как кальцификация сосудов и клапанов сердца. Показана роль отдельных генов и сигнальных каскадов в формировании костной ткани, сопутствующем ангиогенезе, а также в патогенезе ряда заболеваний, связанных с нарушением остеогенной дифференцировки. В то же время, ранние инициаторные механизмы остеогенной дифференцировки всё ещё остаются нераскрытыми. Также неясным остается вопрос о том, протекает ли дифференцировка мезенхимных стволовых клеток различного происхождения сходным образом.

В работе использовали первичные культуры МСК человека следующего происхождения: жировая ткань, пупочный канатик, бедренная кость, пульпа зуба, связка зуба, гингивальные фибробласты. В качестве источника патологической остеогенной дифференцировки использовали интерстициальные клетки аортального клапана пациентов с кальцинирующим аортальным стенозом. Остеогенную дифференцировку МСК индуцировали классическим коктейлем остеогенных факторов (дексаметазон, глицерофосфат кальция и аскорбиновая кислота) и анализировали транскриптомный и протеомный профили дифференцированных и недифференцированных клеток.

Роль эндотелиальных клеток в остеогенной дифференцировке изучали при контактном и бесконтактном культивировании эндотелиальных клеток пуповинной вены с остеобластами человека. После совместного культивирования клеток при индукции остеогенной дифференцировки также анализировали протеомный и транскриптомный профили культур с целью выявления дифференциально экспрессирующихся генов в разных условиях культивирования.

Результаты проведенных исследований приводят к выводу о том, что на молекулярном уровне остеогенная дифференцировка МСК различного происхождения регулируется неодинаково. Патологическая дифференцировка



клеток аортального клапана также отличается от дифференцировки нормальных клеток в остеогенном направлении. Показана критическая роль контакта эндотелиальных клеток с МСК в процессе остеогенной дифференцировки и также продемонстрирована ключевая роль сигнального пути Notch при остеогенной дифференцировке МСК в присутствии эндотелиальных клеток.

Проведенные исследования демонстрируют возможность управления остеогенной дифференцировкой при помощи модификации эндотелиальных клеток, направляющих дифференцировку МСК, как в сторону усиления дифференцировки, так и в сторону ее подавления, что указывает на возможность разработки «терапевтического эндотелия» путем модификации его свойств в отношении влияния на остеогенную дифференцировку.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации по поддержке ведущих научных школ НШ-4664.2022.1.4.



Поиск и анализ мутаций, влияющих на агрегацию пептида амилоид бета

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

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

2. School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

Болезнь Альцгеймера (БА) – нейродегенеративное заболевание, от которого страдают, как правило, люди старшего возраста; характеризуется нарушением памяти и когнитивных функций. Нарастание и усугубление симптоматики БА влечёт за собой невозможность нормальной жизнедеятельности, инвалидизацию, и в конечном итоге приводит к смерти. В настоящий момент БА неизлечима. В связи с этим является актуальным изучение причин и механизмов развития данного заболевания.

Согласно общепринятой гипотезе, основной причиной развития БА является агрегация пептида амилоид бета ($A\beta$), которая, в свою очередь приводит к образованию и накоплению сенильных бляшек в межклеточном пространстве головного мозга. Наиболее амилоидогенным вариантом $A\beta$ является пептид из 42 аминокислотных остатков ($A\beta_{42}$). Причины, приводящие к агрегации пептида $A\beta$, до конца не изучены, также недостаточно исследована структура самих амилоидных фибрилл и олигомеров, формирующихся *in vivo*. В связи с этим важны данные о мутациях в пептиде $A\beta_{42}$, снижающие или повышающие эффективность его агрегации.

В данной работе с помощью дрожжевой системы фенотипической детекции агрегации был осуществлён поиск мутаций, влияющих на эффективность агрегации пептида $A\beta_{42}$. Данная тест-система позволяет детектировать эффективность агрегации белков по характеру роста дрожжей на селективных средах. В результате скрининга было выявлено около 70 значимых мутаций, которые способствовали изменению эффективности агрегации пептида амилоида бета. Также были получены химерные конструкции, в которых отдельные мутантные варианты пептида $A\beta_{42}$ сливали с флуоресцентным белком GFP и анализировали в дрожжевых клетках методом флуоресцентной микроскопии.



На основе полученных данных были выявлены участки в пептиде $A\beta_{42}$, которые наиболее важны для агрегации. Полученные данные также были сопоставлены с известными структурными моделями агрегатов $A\beta_{42}$. В настоящий момент ведутся исследования влияния мутаций на биохимические свойства пептида $A\beta_{42}$.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №20-14-00148,
а также средств гранта Санкт-Петербургского государственного
университета (проект №93025998).*

*Для выполнения исследований использовалась приборная база РЦ «РМиКТ» и
«ЦКП ХРОМАС» научного парка СПбГУ.*



Эффекты анестезии на экспрессию белков теплового шока hsp 70 опухолевыми клетками

Михайлова Е.Р.¹, Ефремов С.М.², Леонова Е.А.², Маргулис Б.А.¹, Гужова И.В.¹

1. Институт цитологии РАН

2. Санкт-Петербургский государственный университет, Клиника высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова, Санкт-Петербург

На сегодняшний день основным методом лечения большинства опухолей является хирургия, которая в большинстве случаев проводится в условиях общей анестезии (внутривенной и/или ингаляционной). При этом известно, что хирургическое вмешательство ассоциировано с риском рецидива и ускорением роста опухоли. Препараты для общей анестезии могут не только оказывать иммуносупрессивное влияние на организм человека, но и влиять на защитные механизмы клеток. Мы показали, что пропофол (внутривенная анестезия, в отличие от севофлурана (ингаляционная анестезия) усиливает синтез белка теплового шока (БТШ70) в опухолевых клетках, что приводит к активации механизмов, способных повысить резистентность раковых клеток к противоопухолевой химиотерапии. Полученные результаты демонстрируют, что вид анестезии напрямую влияет на метаболическую систему раковых клеток и может служить фактором риска раннего послеоперационного рецидивирования.



Исследование роли рецептора следовых аминов TAAR9 в физиологии млекопитающих

Муртазина Р.З.¹, Куварзин С.Р.¹, Жуков И.С.¹, Канов Е.В.¹, Гайнетдинов Р.Р.¹

1. Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

TAAR9 (trace amine-associated receptor 9, TAAR9) относится к небольшому семейству рецепторов следовых аминов. TAAR представляют собой G-белок связанные рецепторы, функция которых активно исследуется. У человека есть 6 функционально активных рецепторов следовых аминов. Известно, что TAAR1 действует как модулятор дофаминовой и серотониновой передачи, а агонист TAAR1 является перспективным средством для лечения шизофрении. В то же время про другие TAAR известно, что они экспрессируются в обонятельном эпителии, однако, появляются данные, что TAAR2 и TAAR5 также функционируют в ЦНС. В данной работе была предпринята попытка исследования функции малоизученного рецептора следовых аминов TAAR9.

Ввиду экспрессии TAAR9 в клетках крови был проведен сравнительный биохимический и гематологический анализ крови крыс, нокаутных по гену *Taar9* (TAAR9-KO). Большинство гематологических и биохимических параметров у нокаутных животных не изменялось. Однако, биохимический анализ выявил снижение уровня общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности в крови крыс TAAR9-KO.

Также в рамках данного исследования была разработана и оптимизирована генетическая конструкция для экспрессии TAAR9 в эукариотических клетках линии НЕК293Т. Для повышения уровня мембранной экспрессии был использован N-концевой таг, состоящий из 9 первых аминокислот бета2-адренергического рецептора. Для оценки мембранной экспрессии TAAR9, необходимой для нормального функционирования GPCR, также была создана генетическая конструкция для экспрессии гибридного белка TAAR9-GFP. Благодаря этому было показано, что TAAR9 довольно слабо экспрессируется на мембране клеток, что, по-видимому, является особенностью всех TAAR и может свидетельствовать о необходимости дополнительных белков для повышения уровня мембранной экспрессии. Был проведен скрининг



соединений различной природы (амины, одоранты, феромоны, нейромедиаторы) методом, основанном на билюминесцентном резонансном переносе энергии (BRET), который направлен на $G\alpha s$ -зависимые сигнальные пути. Было показано, что TAAR9 слабо активируется ($EC_{50} > 50 \mu M$) в ответ на N-метилпиперидин и кадаверин.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 19-75-30008
и РФФИ 20-34-90099/20.*



Нейромодуляция двигательных и висцеральных функций

Мусяенко П.Е.^{1,2}

1. Лаборатория нейропротезов, Институт трансляционной биомедицины СПбГУ

2. Лаборатория нейромодуляции, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН

Проводилась экспериментальная работа по поиску новых подходов нейромодуляции при заболеваниях нервной системы, сопровождающихся нарушениями сенсомоторных и висцеральных функций (травматические поражения спинного и головного мозга, паркинсонизм и др.). Были выявлены интегративные связи между системами нейроконтроля сенсомоторной активности и мочеиспусканием. На острой и хронической моделях животных (крысы, кошки) изучались нейрональные механизмы соматовисцеральной интеграции и возможные пути влияния на активность мочевого пузыря стимуляцией спинного мозга и соматосенсорных афферентных входов. Получены нейрофизиологические данные о соматовисцеральных и висцеро-соматических влияниях. Выявлены особенности работы мочевого пузыря при пассивной ходьбе и локомоции, вызванной стимуляцией спинного мозга, а также зависимость его функциональной активности от особенностей двигательного паттерна. Исследовались механизмы искусственного управления накопительной и эвакуаторной функциями мочевого пузыря. Была апробирована электростимуляция распределенных ростокаудально спинальных нейронных сетей для активации детрузорной и сфинктерной активности. Проводились работы по созданию имплантируемых мультиэлектродных матриц для нейромодуляции. Разработана технология быстрой печати мягких биоэлектронных интерфейсов, которые апробированы на *in-vivo* моделях животных (кошки, крысы) для мониторинга и активации нейронных путей в головном и спинном мозге, а также в нервно-мышечной системе (поперечнополосатая мускулатура конечностей, гладкая мускулатура стенки мочевого пузыря). Полученные результаты могут лечь в основу нового алгоритма нейрореабилитации, сочетающего нейромодуляцию сенсомоторных и висцеральных нейронных сетей спинного мозга с применением персонализированной биоэлектроники.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-15-00092.



Нейрохимические особенности алкогольного потребления у крыс *trh2* нокаутов

Немец В.В.¹, Завьялов В.А.¹, Чепик П.А.¹, Куварзин С.Р.¹, Гайнетдинов Р.Р.¹, Будыгин Е.А.²

1. Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

2. Направление «Нейробиология», Научно-технологический университет «Сириус», Олимпийский пр., 1, Сириус, Краснодарский край, 353340, Россия

Алкогольная зависимость является актуальной проблемой в современном обществе. Чрезмерное потребление алкоголя может приводить к серьезным расстройствам личности, таким как: повышенная агрессивность, асоциальное поведение, депрессия, проблемы с законом. Однако до сих пор не удается однозначно определить нейрохимические корреляты алкогольного поведения. В нашей лаборатории в недавних исследованиях была показана роль дофамина в актуализации appetentной стадии алкогольного потребления (Grinevich, 2021). В литературе имеются противоречивые сведения о роли серотонина в процессе потребления растворов, влияющих на эмоциональное состояние, а именно сладких растворов и алкоголя. Также недостаточно данных о связи серотонинергической и дофаминергической системы в процессе потребления таких растворов. Триптофан гидроксилаза-2 (ТРН2) является ключевым ферментом в синтезе нейронального серотонина (5-НТ), таким образом, целью данного исследования стало исследование особенностей дофаминергической нейротрансмиссии и алкогольного потребления у крыс нокаутов по гену ТРН2. Для исследования нейрохимии алкогольного потребления крыса (самцы и самки) ТРН2 нокауты (КО)/дикий тип (WT) возрастом около 1 года, массой 350-400г подвергались процедуре алкогольного спаивания в течение 85 дней с помощью двухбутылочного теста (раствор/вода), так же исследовалось предпочтение сладких растворов воде в течение 8-19 дней, в отдельной серии экспериментов исследовались особенности дофаминового ответа у самцов ТРН2 нокаутов с помощью метода вольтамметрии *in vivo*.

В результате проведенных исследований было показано, что самцы и самки ТРН2 КО демонстрировали значительно более высокое потребление растворов сахара (10%) ($P < 0,0001$), так же самки демонстрировали увеличение потребления растворов сахара/алкоголя (4-6%) ($P < 0,0001$). С увеличением



концентрации этанола в растворе у самок обеих групп значительно увеличивалось потребление воды ($P < 0,0001$), однако различий между группами не было обнаружено. У самцов ТРН2 КО было обнаружено увеличение потребления воды в процессе потребления сахара ($P < 0,005$). Возможно, данные особенности могут свидетельствовать об особенностях метаболизма нокаутов. Дофаминовый ответ, а также механизмы обратного захвата/релиза не различались между животными, однако было обнаружено значительное снижение скорости восстановления уровня дофамина после процедуры дофаминового истощения у крыс ТРН2 КО по сравнению с диким типом ($P < 0,0001$). В дополнение в отдельных сериях экспериментов у некоторых самцов и самок ТРН2 КО наблюдались черты патологической агрессии (укусы, псевдоссадки) в процессе территориального поведения.

Таким образом, исходя из полученных нами данных, у животных ТРН2 КО нарушен процесс синтеза дофамина, что может быть одной из причин дезрегуляции в мезолимбической системе, а именно в системе вознаграждения. Такие крысы нуждаются в более интенсивном получении вознаграждения, чем обычные крысы. Данная особенность так же приводит к тому, что ТРН2 КО более подвержены алкоголизации.

В результате данной работы можно заключить, что мозговой серотонин играет большую роль в функционировании определенных компонентов дофаминовой системы и системы вознаграждения в целом.

*Работа выполнена при поддержке государственного задания СПбГУ
(ID 93018770).*

Grinevich VP, Krupitsky EM, Gainetdinov RR and Budygin EA (2021) Linking Ethanol-Addictive Behaviors With Brain Catecholamines: Release Pattern Matters. *Front. Behav. Neurosci.* 15:795030. doi: 10.3389/fnbeh.2021.795030



Electrophysiological parameters in rats lacking dopamine transporter

M.A. Ptukha¹, Z.S. Fesenko¹, A.B. Volnova¹, R.R. Gainetdinov¹

1. Laboratory of Neurobiology and Molecular pharmacology, Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University

Dopamine transporter knockout rats (DAT-KO) rats exhibit hyperactivity, compulsivity, behavioral rigidity, deficiencies in motivation, learning and spatial orientation. Due to these behavioral abnormalities and changes in the dopaminergic system, DAT-KO rats have been proposed as an animal model of attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD). Additionally, the complete lack of dopamine transporter (DAT) in these rats makes them an excellent model of persistent hyperdopaminergia, which can be used as a tool to study the mechanisms of other dopamine-associated diseases. Many of these disorders are characterized by electrophysiological changes, including changes in power spectra and coherence. With this work, we aimed to assess these parameters in DAT-KO rats compared to wild type (WT), for which spectral power of prefrontal cortex (PFC), striatum and motor cortex brain activity, as well as interareal coherence were analyzed.

Electrophysiological studies were conducted on 14: 7 DAT-KO and 7 WT adult male rats. Four electrodes were implanted for each animal: PFC, striatum, primary motor cortex (M1) and a reference electrode. Brain activity was recorded for an hour. For each recording, 200 s without artifacts and in wakefulness were selected for analysis. Power spectra and interareal coherence were calculated, where a power spectrum is the frequency to power ratio of the signal, while coherence is a function of frequency, where for two waveforms to be completely coherent at a particular frequency over a given time range, the phase shift between the waveforms at that frequency must be constant, and the amplitudes of the waves at that frequency must have a constant ratio. The resulting data was in the 0.9–75 Hz range after data in the 0–0.8 range was excluded due to the abundance of artifacts. The following ranges for electroencephalographic rhythms were used for analysis and interpretation: delta (0.9–3 Hz), theta (4–8 Hz), alpha (9–11 Hz), lower beta (12–19 Hz), higher beta (20–29 Hz), lower gamma (30–48), higher gamma (52–74 Hz).

Significant differences in power were found in all three analyzed areas. Decreased power of DAT-KO brain activity compared to WT can be clearly seen in the theta range for all three areas. Additionally, in M1 significant differences were



found in the remaining bands, although in those cases power was increased in DAT-KO compared to WT. In DAT-KO striatum, power was also higher than in WT in delta and gamma + higher gamma ranges.

Significant differences were also found in coherence, which was generally lower in DAT-KO than in WT in all cases. In M1-PFC this effect can be seen throughout the whole range, while M1-Str it encompasses all bands except delta and in PFC-Str – all except higher beta and lower gamma.

Some of these results, like the reduced frontal coherence in certain frequency ranges, have been observed in ADHD. Meanwhile, one of the most prominent changes in power spectra in DAT-KO – a significant decrease in the theta range – has been reported as a marker of schizophrenia, while in ADHD the opposite effect has been observed. Overall, electrophysiological characteristics of DAT-KO rats, like their behavioral phenotype, are a marker of significant alterations in functioning of cortico-striatal networks, which have been reported for a variety of disorders, including schizophrenia, ADHD, obsessive-compulsive disorder (OCD) and other impulsive-compulsive disorders, etc..

This work was funded by the RSF grant №21-75-20069.



Современные методы диагностики болезни Альцгеймера

Рубель А.А.¹, Куличихин К.Ю.¹, Федотов С.А.¹, Залуцкая Н.М.², Чернов Ю.О.³

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

2 Учреждение: ФГБУ "НМИЦ ПН им. В.М.Бехтерева В.М." Минздрава России

3. School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

Болезнь Альцгеймера (БА) – одна из наиболее распространённых форм деменции, возникающая, как правило, у людей старшего возраста. По разным данным, заболевание поражает от 5 до 13% людей в возрасте старше 65 лет. В настоящее время, болезнь неизлечима, количество пациентов страдающих от БА неуклонно растёт. Если в ближайшее время не будут разработаны методы для диагностики и лечения БА, то уже в ближайшем будущем она может выйти на лидирующие позиции, среди основных причин смертности в человеческих популяциях.

Ассоциация по изучению болезни Альцгеймера определяет БА как деменцию, связанную с накоплением агрегированных форм пептида Аβ и белка Тау. При этом убедительно доказано, что агрегация Аβ предшествует агрегации Тау. Таким образом, ключевым биохимическим маркером, говорящим о возможном старте патологического каскада при болезни Альцгеймера, является появление мультимерной формы пептида Аβ.

В экономически развитых странах основными методами ранней диагностики БА являются магнитно-резонансная и позитронно-эмиссионная томография головного мозга. Данные методы позволяют диагностировать БА на ранней стадии до появления клинических симптомов, однако слишком дороги и не могут быть использованы для проведения регулярных скрининговых тестов у людей старшего возраста. Альтернативным вариантом диагностики БА является анализ соотношения Аβ и Тау и степени фосфорилирования Тау в цереброспинальной жидкости. Недостатком данных подходов является то, что, повышение уровня гиперфосфорилированного Тау в цереброспинальной жидкости свидетельствует о глубоких нейродегенеративных процессах в мозге. Кроме того, процесс забора цереброспинальной жидкости связан с рисками для здоровья пациентов. Таким образом, на сегодняшний день отсутствуют внедрённые в клинику неинвазивные методы биохимической диагностики и, в особенности, ранней диагностики БА. Это является ключевым для развития



терапевтических подходов потому, что любые терапевтические вмешательства, способствующие замедлению течения заболевания, более эффективны, когда болезнь ещё находится на стадии клинически бессимптомной фазы. Перспективные подходы, которые могли бы быть использованы для создания метода неинвазивной (и возможно, ранней) диагностики могут быть связаны с детекцией агрегированной формы А β в жидкостях организма, в частности в крови.

Для детекции агрегатов А β нами адаптируется метод циклической амплификации агрегатов амилоидогенного белка, известный в англоязычной литературе как Protein Misfolding Cyclic Amplification. Метод позволяет детектировать наличие агрегированных форм белка в образце, даже если они находятся там, в исчезающе малой концентрации. В случае успеха в дальнейшем подход будет применён для ранней постановки диагноза и превентивного вмешательства в дальнейший ход развития болезни Альцгеймера.

Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ ID 93025998.



DNA-nanomachines for nucleic acid detection

Rubel M.¹, Zablotskaya S.¹, Pokatova O.¹, El-Deeb A.¹, Ateiah M.¹, Gorbenko D.^{1, 2}, Shkodenko L.¹, Kolpashchikov D.M.³

1. *ITMO University, St. Petersburg, Russia*

2. *Ioffe Institute, St. Petersburg, Russia*

3. *University of Central Florida, Orlando, FL, USA*

DNA-nanomachines (DNM) are oligonucleotide-based nanostructures that can bind nucleic acids, unwind folded single stranded (ss) RNA or double stranded (ds) DNA targets and provide a signal propagation. DNMs can selectively recognize single nucleotide substitutions (SNS) and provide a fluorescence or colorimetric output. Here we report two DNM variants: (i) DNAzyme-based DNM with fluorescent output [1, Fig. 1] and (ii) G-quadruplex based DNM with visual output [2, Fig.2].

Serial of DNM targeting sequence of 20 human pathogens or mutations in genome were designed. We took in account predicted RNA secondary structure and optimized DNM's positioning using UNAFold and NUPACK software. DNM were assembled from custom-made oligonucleotides and optimized for fluorescent or colorimetric detection of synthetic ssDNA, dsDNA and/or RNA amplicons, unamplified bacterial rRNA or extracted viral RNA.

Optimized DNMs produced signals 1,5 to 4 above the background detect in all cases after 15 to 180 min assays. The sensitivity assays were down to 80 fM for fluorescent sensors and in a micromolar range for visual output producers. Data shows that the sensitivity is dictated by the environmental temperature, length of the recognition arms, its number, type of a core, and type of the nucleic acid, free Gibbs energy of secondary structures and CG% landscape. DNMs selectively recognized SNS under experimental conditions, including room temperature. The G-quadruplex-based DNM are suitable for rapid visual room temperature detection of dsDNA and RNA amplicons. The fluorescent DNMs can quantify nucleic acid without amplification, but require elevated temperature (55°C) and prolonged incubation time.

The results confirm that DNM can be adapted for detection of dsDNA and folded ssRNA of various sequences. The DNM can be adjusted for SNS differentiation under broad experimental conditions. They are made of unmodified



synthetic DNA and, therefore, are relatively inexpensive. DNM can be incorporated in POC diagnostic tests for visual or fluorescent detection of human pathogens.

The study is supported by the RSCF grant (22-24-00664) and by “Priority 2030” program.

1. Cox A.J., Bengtson H.N., Rohde K.H., Kolpashchikov D.M. DNA nanotechnology for nucleic acid analysis: multifunctional molecular DNA machine for RNA detection. *Chem Commun (Camb.)*. 2016;52:14318-14321.
2. Kovtunov E.A., Shkodenko L.A., Goncharova E.A., Nedorezova D.D., Sidorenko S.V., Koshel E.I., Kolpashchikov D.M. Towards point of care diagnostics: visual detection of meningitis pathogens directly from cerebrospinal fluid. *ChemistrySelect*. 2020;5(46):14572-14577.

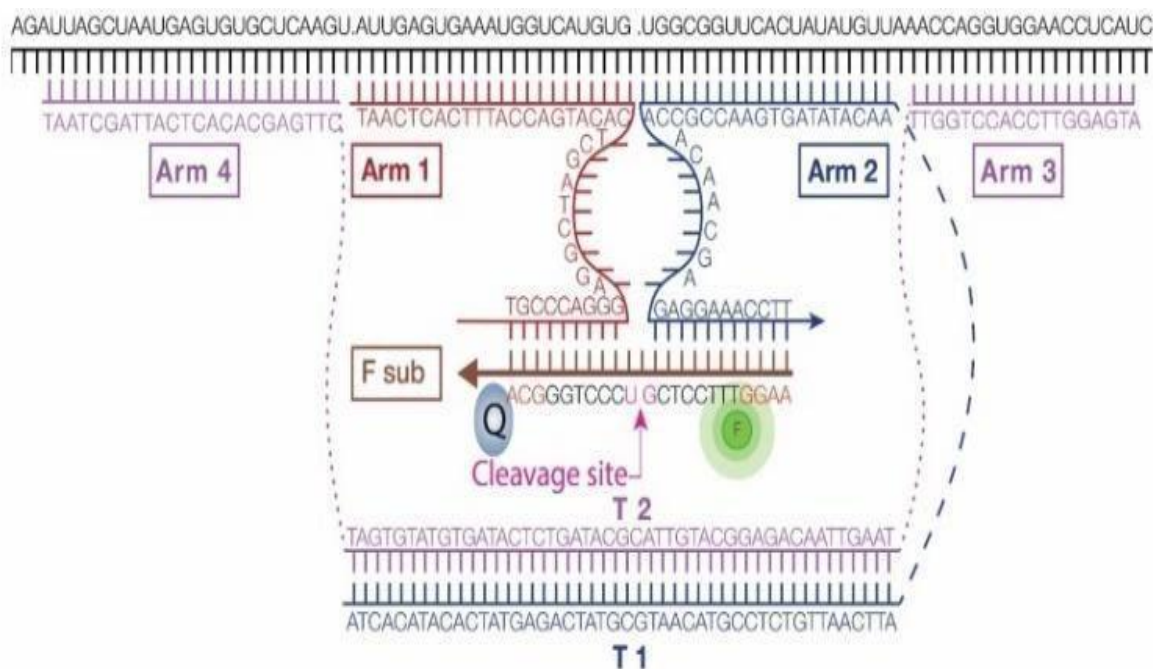


Figure 1. An example of a DNA-nanomachine for a fluorescence detection of coronavirus

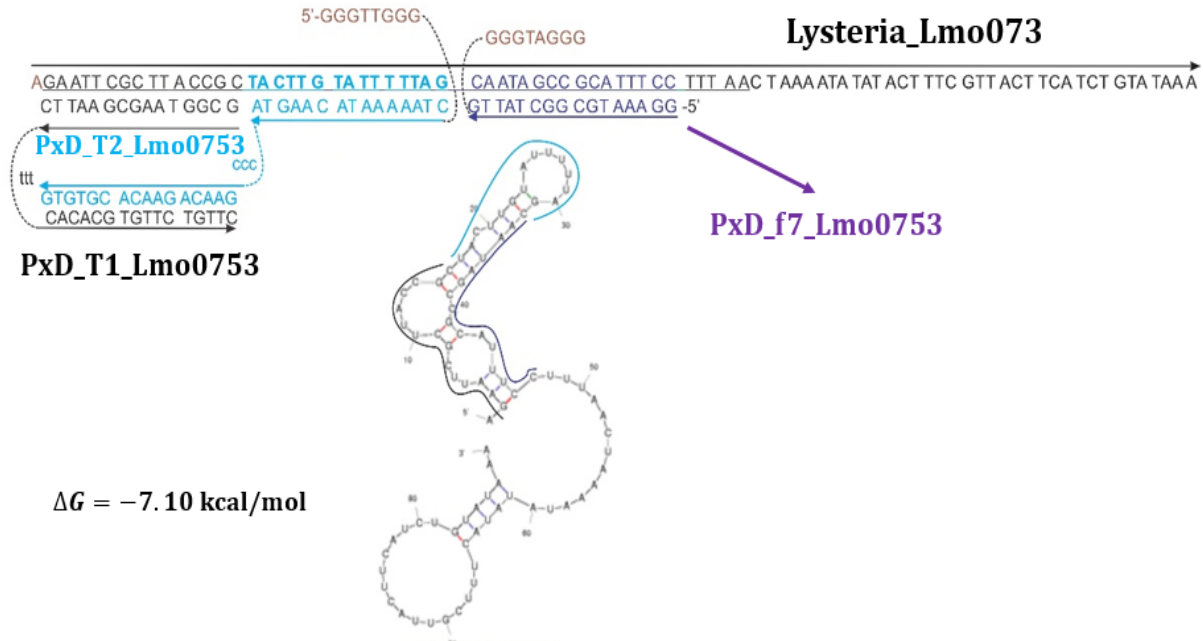


Figure 2. An example of a DNA-nanomachine for colorimetric detection of *Lysteria monocytogenes* and the fragment of interest



Оценка способности транскрипционных факторов человека, участвующих в онкогенезе, формировать амилоиды

Рябинина М.В.¹, Зелинский А.А.¹, Козлова А.В.¹, Солодухина У.Н.¹, Рубель А.А.^{1,2}, Чернов Ю.О.³.

1. Лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

2. Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

3. Технологический институт Джорджии, Атланта, США

Неразветвленные фибриллы белковой природы с межмолекулярной кросс- β структурой называют амилоидами. Повышенный интерес к изучению амилоидов вызван их участием в патогенезе ряда заболеваний (амилоидозов) человека и животных. Однако амилоиды могут не только участвовать в патологических процессах, но и выполнять различные биологические функции, такие как: формирование биопленок бактерий, поддержание долговременной памяти у беспозвоночных животных, участие в синтезе меланина у человека. В рамках исследований, проводимых в Научной лаборатории биологии амилоидов СПбГУ совместно с лабораторией под руководством Михаила Шермана (Ариэльский университет, Израиль), было сделано предположение, что некоторые транскрипционные факторы человека, вовлечённые в онкогенез, могут формировать амилоиды. Для пяти белков предположение было подтверждено с помощью биоинформатического алгоритма ArchCandy [1]. В ходе данной работы мы проанализировали амилоидогенный потенциал исследуемых транскрипционных факторов *in vivo* при помощи дрожжевой тест-системы [2,3]. Также была проанализирована устойчивость агрегатов, формируемых исследуемыми белками в клетках дрожжей, к действию ионных детергентов (3% лаурилсаркозилату натрия). Для белков, продемонстрировавших амилоидогенные свойства в дрожжевой модели, будут продолжены исследования амилоидных свойств *in vitro*, а также планируется исследовать связь амилоидной агрегации изучаемых белков с развитием онкологических заболеваний.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №20-14-00148, а также Санкт-Петербургского государственного университета (проект №93025998).



- [1] Ahmed A. B. et al. A structure-based approach to predict predisposition to amyloidosis // *Alzheimer's & Dementia*. – 2015. – Т. 11. – №. 6. – С. 681-690.
- [2] Chandramowlishwaran P. et al. Mammalian amyloidogenic proteins promote prion nucleation in yeast // *Journal of Biological Chemistry*. – 2018. – Т. 293. – №. 9. – С. 3436-3450.
- [3] Chernoff Y. O. et al. Application of yeast to studying amyloid and prion diseases // *Advances in genetics*. – 2020. – Т. 105. – С. 293-380.



Фундаментальное и практическое значение изучения дупликаций в геноме

Сайфитдинова А.Ф.¹

*1. ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена», кафедра анатомии и физиологии человека и животных факультета биологии;
АО «Международный центр репродуктивной медицины», лаборатория вспомогательных репродуктивных технологий, Санкт-Петербург, Россия; saifitdinova@mail.ru*

Геномы всех организмов характеризуются наличием копий некоторых последовательностей ДНК, которые могут представлять собой повторенные элементы различной длины, обладающие различными функциональными характеристиками и по-разному организованные в геноме. Долгое время бытовала точка зрения об отсутствии какой-либо роли таких дупликаций, однако последние достижения в исследовании организации геномов представителей различных видов свидетельствуют о функциональной значимости таких повторенных элементов. В эволюции дупликации происходили как на уровне отдельных последовательностей, так и на уровне целых геномов, сопровождаясь на ранних этапах увеличением пloidности. Такая генетическая избыточность легла в основу новых функций, что подтвердило высказанное в начале 70х годов японским генетиком Сусуму Оно (Susumu Ohno) предположение о роли дупликаций в филогенезе (Evolution by Gene Duplication). Исследование повторенных и недостаточно сильно дивергировавших дупликаций методами массового параллельного секвенирования может представлять сложность на этапе сборки геномных данных, для преодоления которых приходится прибегать к методам секвенирования протяженных последовательностей. Их использование позволило существенно восполнить пробелы в имеющихся данных, а также продвинуться в понимании роли некоторых повторенных элементов.

Помимо обсуждения эволюционного значения дупликаций, в докладе будут рассмотрены примеры функционально значимого изменения числа копий повторов, а также рассмотрены современные методы изучения геномов на основе секвенирования с длинными прочтениями. Будет освещен собственный опыт автора в развитии и применении методов секвенирования третьего поколения для решения фундаментальных и прикладных задач, а также сделан акцент на разборе реального клинического случая выявления протяженной делеции в геноме человека в участке, имеющем высокогомологичные копии,



которые привели к развитию тяжелого нарушения сперматогенеза. Результаты молекулярно-генетического исследования позволили установить причины нарушения формирования акросомы и выработать стратегию преодоления репродуктивных проблем у конкретного пациента со 100% глобулозооспермией. Использование кальциевого ионофора для компенсации функционального дефекта позволило получить развивающиеся эмбрионы после оплодотворения методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида с морфологическими аномалиями. Картирование делеции также даст возможность разработать надежный способ выявления геномной патологии, в том числе гетерозиготного носительства, для предотвращения возникновения нарушения сперматогенеза в следующих поколениях.



New developments in the area of diffusion NMR for protein systems

Kharkov B.B.^{1†}, Podkorytov I.S.^{1†}, Salikov V.A.^{1†}, Lebedenko O.O.^{1†}, Izmailov S.A.¹,
Luzik D.A.¹, Bondarev S.A.², Belousov M.V.^{2,3}, Zhouravleva G.A.², Skrynnikov
N.R.^{1,4}

1. Laboratory of biomolecular NMR, St. Petersburg State University, St. Petersburg 199034, Russia

2. Department of Genetics and Biotechnology, St. Petersburg State University, St. Petersburg 199034, Russia

3. Laboratory for Proteomics of Supra-Organismal Systems, All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology (ARRIAM), 196608 St. Petersburg, Russia

4. Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-2084, USA

† These authors contributed equally

Diffusion NMR experiments are extensively used for characterization of macromolecules and macromolecular assemblies. The range of problems addressed by diffusion NMR includes protein-ligand interactions, protein oligomerization and aggregation, protein folding, formation of supramolecular assemblies and a host of other applications. In this talk, I will discuss three recent advances in this area originating from the work of our laboratory.

For extended objects, such as amyloid fibrils, diffusion NMR experiments become difficult to interpret because in addition to translational diffusion they are also sensitive to rotational diffusion. We have constructed a mathematical theory describing the outcome of PFG NMR experiments on rod-like fibrils. The effect of rotational diffusion is indeed significant, accounting for up to 30% of the diffusion-induced signal loss. However, just like translational diffusion, rotational diffusion of heavy fibril particles is a slow process and registers as such in the PFG NMR experiments. Contrary to recent literature claims, this allows one to separate spectral signals from fibrils and other species that may be present in the sample (monomers, proteolytic fragments, etc.) based on their different diffusion properties. To test the validity of our theory, we have studied fibrils formed by Sup35NM fragment derived from yeast release factor Sup35. The presence of disordered M domain in Sup35NM fibrils makes it possible to observe spectral signals from the fibrils by means of solution-state NMR. The experimental results are in good agreement with the theoretical predictions, paving the way for diffusion-NMR investigation of complex amyloidogenic systems.



Oftentimes, diffusion NMR measurements are conducted on samples with low concentration as dictated by limited solubility of the species of interest or high cost of the material, which complicates accurate determination of diffusion parameters. The situation is compounded by baseline distortions, caused by residual solvent signals or various instrumental reasons. In response to these challenges, we have developed a new data processing scheme to treat the data from 1D diffusion NMR experiments. The algorithm generates a spectral template that is subsequently used to fit the individual spectra from a series of gradient-strength-dependent spectra. The template is constructed as a weighted average of all individual spectra in the series, employing the principle of optimal filtration. The new data processing scheme has been implemented in a form of web server named DDfit (Diffusion Data fit, <https://ddfit.bio-nmr.spbu.ru>). The server has been tested on the simulated spectral data from the protein ubiquitin, as well as the experimental data from protein lysozyme collected in house. The new processing scheme proved to be both more accurate and more precise compared to the standard schemes available in the programs TopSpin and MestreNova.

Diffusion NMR also provides a unique insight into the behavior of the so-called disordered proteins, which play a prominent role in neuropathological disorders as well as cancers. Intrinsically disordered proteins (IDPs) lack conventional structure and are best modeled in a form of conformational ensembles. Since recently such conformational ensembles can be effectively generated by means of Molecular Dynamics (MD) simulations. However, these computational efforts require rigorous experimental validation. Yet, the range of experimental tools to conduct such validation is very limited (e.g. none of the standard methods such as X-ray crystallography are applicable). In this situation, diffusion NMR measurements become one of the major sources of experimental information on IDPs. In our work, we have measured the diffusion parameters for the disordered N-terminal tail of the histone protein H4 (N-H4) and demonstrated that these parameters can be successfully reproduced in a series of MD simulations using the simulation cells of increasing size and the latest-generation water model OPC. The OPC trajectories were also successful in reproducing ^{15}N spin relaxation rates of N-H4, which are a function of extensive conformational dynamics observed in this disordered peptide. In addition, we have shown that MD trajectories employing OPC water can accurately predict both translational and rotational diffusion coefficients of the small globular protein ubiquitin. In summary, diffusion NMR in conjunction with the MD modeling provides a promising avenue for investigation of disordered protein systems.



Санкт-Петербургский
государственный
университет



This study has been supported by the grant 92425251 from St. Petersburg State University.

We acknowledge the CC, MRR, CAMR, MCT, XRD, TCR, DFM and OLMR resource centers within the Research Park of SPbU.



Взаимодействие синаптических белков Nwk и Dap160 необходимо для формирования однородной популяции синаптических везикул

Сопова Е.С.¹, Коренькова О.М.¹, Шишков А.Г.¹, Нифантова Н.В.¹, Линовская Ю.В.¹, Онохин К.В.¹, Шупляков О.В.^{1,2}.

1. Лаборатория биологии синапсов, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия;

2. Отдел нейронаук, Каролинский Институт, г. Стокгольм, Швеция

Нервные окончания содержат многочисленные синаптические везикулы, заполненные нейромедиатором (СВ). Везикулы сливаются с клеточной мембраной в активной зоне контакта (синапса) с другими нервными клетками в период активности и высвобождают нейромедиатор в синаптическую щель. СВ формируются заново в нервных терминалях в результате эндоцитоза пресинаптической мембраны и заполняются нейромедиатором. Таким образом совершается синаптический цикл, который поддерживает процесс выделения медиатора в контактах между нервными клетками. Везикулы в нервных терминалях имеют одинаковый диаметр. Это гарантирует, что нейромедиатор при секреции будет выделяться в виде одинаковых порций или «квантов». Нарушение молекулярных механизмов, обеспечивающих формирование однородной популяции везикул, приводит к дефектам синаптической передачи и возникновению различных патологий. Каким образом обеспечивается уникальная однородность популяции СВ, до конца не выяснено.

Синаптическим циклом управляет большое количество белков. Один из них – Nervous Wreck (Nwk), который принадлежит к семейству F-BAR (Fer/Cip4 homology BAR) мембрансвязывающих белковых молекул. Ранее было показано, что он контролирует сборку актиновых филаментов, активируя комплекс, стимулирующий полимеризацию актина – WASp (Wiskott–Aldrich syndrome protein)/Arp2/3 (actin-related protein 2/3) [1]. В нервных терминалях дрозофилы с нокаутом гена *nwk* наблюдаются синаптические везикулы различного размера. Целью нашего исследования было выяснить, какие межмолекулярные взаимодействия регулируют функции данного белка в формировании однородной популяции синаптических везикул. В экспериментах мы исследовали роль взаимодействия Nwk со скаффолд-белком Dap160.



В качестве модельной системы мы использовали нервномышечные синапсы банановой мушки, дрозофилы. Этим организмом можно легко манипулировать различными генетическими методами. В экспериментах использовали мутантов с нокаутом Nwk и Dap160, а также «rescue» мутантов, у которых в структуре белков отсутствовали определенные функциональные домены. Методологические подходы, использованные в работе, были описаны ранее [2].

Наши исследования показали, что Nwk меняет свою локализацию в нервной терминали при синаптической активности. В состоянии покоя Nwk локализуется в периактивной зоне синапса на границе кластера синаптических везикул. Взаимодействие с SH3C доменом Dap160 перемещает Nwk в область пресинаптической мембраны, где происходит реформирование синаптических везикул. Взаимодействие между двумя белками регулируется фосфорилированием. У мутантов, у которых Dap160 лишен SH3C домена, рекрутирование Nwk не происходит. При нарушении взаимодействия между Dap160 и Nwk, а также у мутантов, у которых в структуре Nwk отсутствовал F-BAR домен, позволяющий белку связываться с пресинаптической мембраной, синаптические везикулы в нервномышечных синапсах имели различные диаметры. При синаптической активности также происходило образование больших эндосом. Электрофизиологические эксперименты выявили нарушения в синаптической передаче, которые коррелировали со структурными изменениями в нервномышечных синапсах.

Наши эксперименты показывают, что рекрутирование F-BAR белка Nwk с помощью скаффолд-белка Dap160 к мембране формирующегося синаптического пузырька в процессе эндоцитоза, является важным этапом формирования однородной популяции синаптических везикул при синаптической активности.

*Исследования финансировались из проекта 93026688 СПбГУ
и грантов Российского научного фонда 21-15-00227 и
Шведского Научного Совета.*

- [1] Coyle, I. P. *et al.* Nervous wreck, an SH3 adaptor protein that interacts with Wsp, regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* **41**, 521-534 (2004).



- [2] Rodal, A. A., Motola-Barnes, R. N. & Littleton, J. T. Nervous wreck and Cdc42 cooperate to regulate endocytic actin assembly during synaptic growth. *J Neurosci* **28**, 8316-8325, doi:28/33/8316 [pii]10.1523/JNEUROSCI.2304-08.2008 (2008).

Поиск экзогенных и эндогенных факторов, способных модифицировать мутагенную активность цитозиндезаминаз AID/APOBEC

Степченкова Е.И.^{1,2}, Зотова И.В.^{2,3}, Грушина В.А.⁴, Кравцова Е.В.⁴, Павлов Ю.И.⁵

1. Кафедра генетики и биотехнологии, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

2. Лаборатория мутагенеза и генетической токсикологии, СПбФ ИОГен РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

3. Лаборатория биологии амилоидов, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

4. Кафедра Молекулярной биотехнологии, СПбГТИ(ТУ), Санкт-Петербург, Россия

5. Eppley Institute for Research in Cancer; Fred and Pamela Buffett Cancer Center, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, 68198, USA

Анализ мутационных подписей, представляющих собой характерную комбинацию специфических мутаций в определенном контексте последовательности ДНК, позволяет судить о силе и продолжительности действия определенного мутагенного фактора. К настоящему времени в геномах раковых клеток идентифицировано несколько десятков подписей различных мутационных процессов, две из них (№ 2 и № 13) принадлежат цитозиндезаминазам семейства AID/APOBEC. Связь мутационных подписей № 2 и № 13 с высокой активностью AID/APOBEC была подтверждена при изучении мутагенной активности этих ферментов в микробных моделях. Мутационные подписи AID/APOBEC обнаружены более чем в половине случаев рака, это определяет актуальность исследования факторов, влияющих на мутагенную активность цитозиндезаминаз. Целью данной работы является поиск факторов способных модифицировать (снижать или усиливать) мутагенную активность цитозиндезаминаз. В работе исследовали влияние ряда мутагенных факторов на AID/APOBEC-зависимый мутагенез. В частности, мы исследовали действие УФ-излучения, аналога азотистых оснований 6-гидроксиламинопурина (ГАП), цисплатина, а также влияние генов контролирующих ответ клетки на повреждение ДНК (REV1, REV3, RAD52, HST3, HST4), на параметры мутагенеза у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, экспрессирующих гены цитозиндезаминаз человека (APOBEC3A) и морской миноги (PmCDA1). Анализ частоты мутагенеза у штаммов, экспрессирующих



гены цитозиндезаминаз PmCDA1 и APOBEC3A показал, что при воздействии на клетки УФ-излучения, ГАП и цисплатина наблюдается аддитивное возрастание мутагенеза. Одновременная инактивация генов HST3 и HST4, приводит к синергическому возрастанию мутагенеза, зависимо от активности цитозиндезаиназ. Инактивация или сверхэкспрессия генов мутасомы (REV1 и REV3) не влияет на частоту мутаций, индуцированных цитозиндезаминазами, при этом на фоне делеции гена RAD52 частота мутагенеза снижена по сравнению с ожидаемыми значениями. Таким образом, нам удалось выявить факторы, которые способны повышать или снижать мутагенную активность цитозиндезаминаз, а также те факторы, которые не влияют на частоту AID/APOBEC-зависимого мутагенеза.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 20-15-00081.



Изучение роли серотонинергической системы в восстановлении двигательных функции после травмы спинного мозга на модели ТРН2 крыс

Сысоев Ю.И.^{1,2,3,4}, Приходько В.А.^{3,4}, Безручко М.В.¹, Чалышева А.Е.¹, Шкорбатова П.Ю.², Баженова Е.², Мусиенко П.Е.^{1,2}

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

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

3.Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

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

Травматическое поражение спинного мозга - важная медико-социальная проблема, затрагивающая ежегодно миллионы людей во всем мире. Как правило, она сопровождается нарушениями работы сенсорных путей, а также двигательными и висцеральными расстройствами (например, дисфункцией мочевого пузыря). Одной из приоритетных задач нейрореабилитационных подходов является переобучение и увеличение пластичности спинальных нейрональных сетей, оставшихся неповреждёнными после травмы. Для эффективной трансляции результатов экспериментальных исследований в клиническую практику необходимо глубокое понимание роли различных нейромедиаторных систем в нейрогенезе и синаптической пластичности. На основании литературных данных, серотонинергическая система имеет ключевое значение в нейрореабилитационных процессах, о чем свидетельствует тот факт, что аксоны серотонинергических нейронов демонстрируют способность к прорастанию и регенерации в ответ на повреждение ЦНС. Крысы с дефицитом триптофан-гидроксилазы 2 типа (ТРН2 КО) лишены серотонина в головном и спинном мозге, вследствие чего являются интересной моделью для изучения роли серотонинергической системы в функциональном восстановлении после ТСМ. В настоящей работе было проведено сравнение скорости восстановления двигательной функции задних конечностей самок крыс дикого типа (WT) и ТРН2 КО после латеральной левосторонней гемисекции спинного мозга.



Исследование проводили в соответствии с принципами Базельской декларации, Приказом Минздрава РФ от 01.04.16 г. № 199н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” и рекомендациями биоэтической комиссии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Крыс содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе, со свободным доступом к воде. Эксперименты были выполнены на 12 (6 WT и 6 TRH2 KO) крысах самках возрастом 13-16 месяцев. Оценку двигательной функции задних конечностей крыс проводили за неделю перед гемисекцией, а также в конце каждой недели в течение 4-х недель после операции в тестах «Сужающаяся дорожка», «Ladder walking test» и «Static rod». В проводимых тестах оценивали количество ошибок и соскальзываний, а также общее количество шагов и рассчитывали степень сенсомоторного дефицита, выражаемую в процентах. При выполнении тестов у каждой крысы было по три попытки, данные выражали как среднее значение трех попыток. Латеральную гемисекцию у животных осуществляли на уровне T8 позвонка под изофлюрановым наркозом. Также, для оценки степени восстановления двигательной функции задней конечности в конце 4-й недели после операции проводили электромиографическое исследование. У наркотизированных хоралгидратом (400 мг/кг, в/б) животных оценивали амплитуды ответов в мышцах *tibialis anterior* и *gastrocnemius medialis* при электрической стимуляции седалищного нерва, а также чрезкожной стимуляции поясничного отдела спинного мозга (на уровне L5-L6 позвонков). Результаты выражали как соотношение максимальных амплитуд ответов в изучаемых мышцах слева и справа. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 7.00. Осуществляли проверку нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений с использованием W-критерия Шапиро–Уилка, оценивали значимость различий при распределении, отличном от нормального количественных признаков с помощью t-критерия Стьюдента, а при ненормальном распределении – с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

В результате проведенной работы не было обнаружено различий в двигательных способностях задних конечностей у животных WT и TRH2 KO, о чем свидетельствуют данные тестов «Сужающаяся дорожка», «Ladder walking test» и «Static rod». Латеральная гемисекция вызывала тяжелый двигательный дефицит ипсилатеральной задней лапы у крыс обеих групп ($p < 0.01$ по сравнению с собственными значениями) во всех трех проводимых тестах. У животных WT происходило частичное восстановление двигательной функции в



тестах «Сужающаяся дорожка» и «Ladder walking test», а в тесте «Static rod» только у половины крыс было отмечено частичное функциональное восстановление. В тестах «Сужающаяся дорожка» и «Ladder walking test» степень сенсомоторного дефицита животных ТРН2 КО было значимо выше на 3-ю и 4-ю недели после операции ($p < 0.05$ и $p < 0.01$, соответственно). По данным электромиографического тестирования было выявлено, что соотношение максимальных амплитуд ответов мышцы *gastrocnemius medialis* ипсилатерально и контрлатерально к месту повреждения при стимуляции поясничного отдела спинного мозга было ниже ($p < 0.05$) у крыс группы ТРН2 КО по сравнению с животными WT.

Крысы с дефицитом серотонина в головном и спинном мозге (ТРН2 КО) имеют меньшую способность к спонтанному восстановлению двигательной функции задних конечностей при одностороннем поражении спинного мозга на 3-ю и 4-ю недели после операции. Полученные данные подтверждают важную роль серотонина в функциональном восстановлении при поражении ЦНС, а также позволяют рассматривать крыс ТРН2 КО как релевантную модель для изучения нейрореабилитационных механизмов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ
МК-2765.2021.1.4.*



Изучение паттерна экспрессии генов, кодирующих рецепторы следовых аминов TAAR9

Сюткина А.С.¹, Муртазина Р.З.¹, Гайнетдинов Р.Р.¹

1. Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

Психоневрологические расстройства широко распространены в мире, и исследование механизмов, лежащих в основе возникновения этих патологий, представляет особый интерес для современной медицины. Поэтому поиск мишеней для разработки эффективной терапии этих заболеваний является актуальной задачей. Одной из таких мишеней могут быть рецепторы следовых аминов.

Следовые амины – это биогенные соединения, которые обнаруживаются в тканях мозга в чрезвычайно малых концентрациях и имеют сходную структуру с классическими моноаминовыми нейротрансмиттерами. Функция этих соединений оставалась неизвестной до обнаружения рецепторов следовых аминов в 2001 году.

Рецепторы следовых аминов (TAARs, Trace Amine-Associated Receptors) представляют собой отдельную группу рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCRs). Их экспрессия обнаружена в обонятельном эпителии, в центральной нервной системе, а также во многих органах и тканях.

У млекопитающих гены, кодирующие рецепторы следовых аминов (*TAAR1* – *TAAR9*), расположены в шестой хромосоме человека, в локусе, связанным с предрасположенностью к развитию шизофрении и аффективных психических расстройств.

В настоящее время роль TAAR9 в физиологии и патологии млекопитающих изучена плохо. Поэтому целью текущего исследования является изучение паттерна экспрессии гена, кодирующего рецептор следовых аминов, *TAAR9*, у крысы, одного из модельных организмов.

В работе использовали крыс самцов и самок породы Sprague Dawley возрастом 2,5 месяца (самки) и 9,5 месяцев (самцы). Получали образцы тканей головного мозга и периферических органов и выделяли РНК. Оценку



экспрессии проводили с помощью ПЦР в реальном времени с использованием кДНК в качестве матрицы.

В результате данного эксперимента было подтверждено наличие TAAR9 в обонятельном эпителии и яичке самца, а также впервые была обнаружена экспрессия *TAAR9* в продолговатом мозге и среднем мозге, что может свидетельствовать о функции TAAR9 в ЦНС.

Таким образом, результаты, полученные в ходе данного исследования, позволят оценить возможную роль рецепторов следовых аминов в функционировании ЦНС и развитии различных заболеваний человека.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-75-30008.



Современные подходы в неинвазивной диагностике ренальных амилоидозов

Федотов С.А.^{1,2}, Храброва М.С.³, Анпилова А.О.³, Чернов Ю.О.⁴, Рубель А.А.^{2,5}

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

2. Лаборатория сравнительной генетики поведения, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия

3. Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, г. Санкт-Петербург, Россия

4. School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, USA

5. Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия

Амилоидозы – это гетерогенная группа неизлечимых заболеваний, патогенез которых связан с аномальной укладкой белка, формированием амилоидных агрегатов и их накоплением в тканях, что приводит к нарушениям в работе органов вплоть до полного прекращения их функционирования. Амилоиды представляют собой фибриллы из упорядоченно сложенных белков, которые соединены между собой водородными связями с образованием межмолекулярной кросс-бета складчатой структуры. В случае системных амилоидозов развитие заболевания связано с увеличением уровня и/или аномальным синтезом определенных типов белков в организме при наличии патологического процесса как, например, моноклональная гаммапатия и хроническое воспаление при ревматоидном артрите. Лечение амилоидозов направлено на снижение уровня продукции амилоидогенного белка и подавление его агрегации. При этом в зависимости от типа амилоидозов применяются различные терапевтические подходы, что подчеркивает важность ранней дифференциальной диагностики. В настоящее время, наиболее точная диагностика амилоидозов и его типов осуществляется путем анализа биопсийного материала, взятого из затронутого болезнью органа. Однако отсутствие специфичных симптомов развития амилоидозов и инвазивный характер забора биоматериала является причиной диагностирования данной группы заболеваний на поздних стадиях, что существенно снижает эффективность терапевтических мер. Создание неинвазивных методов диагностики и поиск специфических маркеров амилоидозов необходимо для



выявления заболевания и определения его типа на более ранних стадиях, что, в свою очередь, позволит своевременно и направленно начать лечение.

В нашей работе мы рассматриваем существующие на данный момент подходы в диагностике амилоидозов, в первую очередь с ренальным вовлечением, и возможные направления дальнейших исследований для разработки новых специфичных тестов для ранней диагностики. Одним из основных направлений неинвазивной диагностики является разработка сканирующих методов исследования (радиография и компьютерная томография). Но их применение ограничивается лишь поздними стадиями развития амилоидоза, когда возникают выраженные системные нарушения на фоне значительных отложений амилоидных агрегатов в органах. Другим направлением неинвазивной диагностики является анализ жидкостей организма, которое нацелено на обнаружения факторов и маркеров заболевания до возникновения выраженных системных нарушений, трудно поддающихся терапевтическому воздействию. К данным методам относится иммунологическая и масс-спектрометрическая детекция белков-предшественников в крови и моче больных, выявление мутаций в генах этих белков. Данные методы демонстрируют высокую чувствительность в диагностике отдельных типов амилоидоза в группах риска, однако специфичность этих методов остается крайне низкой. В качестве решения проблемы предлагаются подходы для тестирования, основанные на функциональных свойствах белков предшественников. В частности, высокий амилоидогенный потенциал иммуноглобулинов легких цепей у больных AL-амилоидозом позволяет дифференцировать этих больных от пациентов с множественной миеломой. Дальнейшее изучение свойств функциональных и патологических амилоидов в организме человека может обеспечить разработку новых неинвазивных методов диагностики и лечения амилоидозов.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-25-00315,
<https://rscf.ru/project/22-25-00315/>*



Особенности изменений электрофизиологических характеристик при гипердофаминергии и гиподофаминергии у ДАТ-КО крыс

Фесенко З.С.^{1,2}, Птуха М.А.^{1,2}, Мор М.С.^{1,2}, Вольнова А.Б.^{1,2}, Ефимова Е.В.², Гайнетдинов Р.Р.^{2,3}

1. Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия.

2. Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия.

3. Клиники высоких медицинских технологий имени Н. И. Пирогова СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Уникальной особенностью нокаутных по дофаминовому транспортеру крыс (ДАТ-КО) является хроническое состояние гипердофаминергии. Ранее на ДАТ-КО мышах (3, 4) было продемонстрировано, что, блокируя работу фермента синтеза дофамина тирозингидроксилазы с помощью альфа-метил-паратирозина (АМРТ), у ДАТ-КО мышей возможно временно добиться полного истощения дофамина. Наличие двух крайних состояний функционирования дофаминергической системы – гипо- и гипердофаминергии – позволяет проводить оценку трансляционного потенциала животных линии ДАТ-КО в отношении дофамин-ассоциированных заболеваний, таких как СДВГ, болезнь Паркинсона и др. В данной работе был проведен перенос модели “нулевого дофамина” с ДАТ-КО мышей на ДАТ-КО крыс, что было подтверждено с помощью процедуры микродиализа. Параллельно с ней, в данном исследовании был проведен анализ изменений электрической активности мозга с помощью метода электроэнцефалографии и регистрации локальных потенциалов поля как в состоянии гипердофаминергии, так при наступлении гиподофаминергии после введения АМРТ.

Эксперименты проводились на взрослых крысах ДАТ-КО и WT. Внутримозговые электроды имплантировались в стриатум (ML +3; AP 0; DV 5) и префронтальную кору (ПФК) (ML +1; AP +2; DV 2,5); эпидуральный электрод устанавливался над моторной корой (M1) (ML -1,5; AP -1,5). Активность головного мозга регистрировали в течение 2,5 часов: 30 минут фоновой активности и затем 2 часа после внутрибрюшинного введения АМРТ (150 мг/кг). Для оценки внеклеточного уровня дофамина в стриатум имплантировалась микродиализная мембрана (ML +3; AP 0; DV 5). Пробы собирались в течение 6 часов через каждые 20 минут: 2 часа фона, 2 часа после



инъекции АМРТ и 2 часа после инъекции L-DOPA. Оценка уровня дофамина производилась методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Анализ микродиализных проб показал, что фоновый уровень дофамина значительно выше у крыс DAT-KO по сравнению с WT ($p < 0.05$ Wilcoxon test). Под действием АМРТ уровень дофамина у WT практически не изменяется, в то время как у DAT-KO крыс он опускается практически до нуля ($p < 0.05$ Wilcoxon test), повышаясь после внутрибрюшинной инъекции L-DOPA+carbidopa ($p < 0.05$ Wilcoxon test).

Фоновая электрическая активность у крыс WT и DAT-KO показала достоверные различия в диапазоне тета-ритма: у нокаутных крыс его мощность значительно снижена ($p < 0.0001$, two-way ANOVA). Введение АМРТ приводит к отличным эффектам у обеих групп. Спектрограмма WT показала достоверное увеличение мощности тета-ритма в стриатуме ($p < 0.01$, two-way ANOVA) и ПФК ($p < 0.01$, two-way ANOVA), однако у DAT-KO был обнаружен противоположный эффект – снижение мощности тета-ритма (ПФК: $p < 0.01$; стриатум: $-p < 0.05$, two-way ANOVA). Отдельно необходимо отметить обнаружение на спектрограмме всех исследуемых животных после введения АМРТ сдвига пиковой частоты в сторону более низких частот внутри тета-диапазона.

Тета-ритм, генерируемый гиппокампом, регистрируется во многих областях, ассоциируется с исследовательским поведением, пространственной памятью и рабочей памятью (1, 2). Снижение тета-ритма у DAT-KO крыс может являться электрофизиологическим маркером характерного для них нарушения рабочей памяти и процесса обучения. Возможно, именно наблюдаемое падение двигательной и, соответственно, исследовательской активности после введения АМРТ у DAT-KO крыс на спектрограмме отражается в виде снижения мощности тета-ритма. Таким образом, данной работой показана возможность использования DAT-KO крыс, наравне с DAT-KO мышами, для моделирования гиподофаминергического состояния. Кроме того, результаты работы продемонстрировали характерные для каждого из описанного выше состояния дофаминовой системы паттерны активности ряда областей головного мозга.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-75-20069.



1. Begus, K., and Bonawitz, E. (2020). The rhythm of learning: Theta oscillations as an index of active learning in infancy. *Developmental Cognitive Neuroscience* 45, 100810. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2020.100810>.
2. Kaplan, R., Doeller, C.F., Barnes, G.R., Litvak, V., Düzel, E., Bandettini, P.A., and Burgess, N. (2012). Movement-Related Theta Rhythm in Humans: Coordinating Self-Directed Hippocampal Learning. *PLoS Biol* 10, e1001267. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001267>.
3. Sotnikova, T.D., Beaulieu, J.-M., Barak, L.S., Wetsel, W.C., Caron, M.G., and Gainetdinov, R.R. (2005). Dopamine-Independent Locomotor Actions of Amphetamines in a Novel Acute Mouse Model of Parkinson Disease. *PLoS Biol* 3, e271. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030271>.
4. Sotnikova, T.D., Caron, M.G., and Gainetdinov, R.R. (2006). DDD mice, a novel acute mouse model of Parkinson's disease. *Neurology* 67, S12–S17. https://doi.org/10.1212/WNL.67.7_suppl_2.S12.



Исследование специфичности узнавания ДНК нуклеазами семейства Cas12

Фотина А. С.¹, Сопова Ю. В.^{1,2}, Зелинский А.А.², Чиринскайте А.В.¹, Устабаев П.Ш.¹, Леонова Е.И.¹

1. Центр трансгеноза и редактирования генома, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

2. Лаборатория биологии амилоидов, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

Технология редактирования геномов эукариот на основе системы CRISPR-Cas получает широкое развитие и применение в последние годы. Ежегодно исследователи открывают новые Cas-белки с различными свойствами, позволяющими применять их в качестве инструментов в различных направлениях, от редактирования геномов до диагностических тест-систем. Однако, несмотря на быстрый темп исследований в данной области, детальные свойства многих описанных белков семейства Cas12 изучены недостаточно подробно. В состав семейства Cas12 входит 3 подсемейства: белки Cas12a, Cas12b и Cas12f (или Cas14). Нуклеазы Cas12b производят PAM-зависимое (канонический PAM 5'-DTTN-3') направленное расщепление двунитовой ДНК и обладают неспецифической коллатеральной нуклеазной активностью по отношению к однонитевым молекулам ДНК.

В нашей лаборатории был успешно наработан и очищен функциональный фермент Cas12b из организма *Alicyclobacillus acidiphilus* (AaCas12b). Мы проанализировали специфичность разрезания ферментом AaCas12b целевой ДНК и обнаружили, что в случае наличия однонитевых неспаренностей между направляющей РНК и целевой ДНК примерно в половине положений мы наблюдали расщепление мишени, что указывает на невысокую специфичность фермента.

Мы впервые показали, что нуклеаза AaCas12b способна узнавать неканонический PAM 5'-CTTA-3'. Мы сравнили активность и специфичность нуклеазы при использовании двух вариантов PAM (5'-TTTA-3' и 5'-CTTA-3') и продемонстрировали, что PAM 5'-CTTA-3' обеспечивает более низкую эффективность, но более высокую специфичность расщепления целевой ДНК.

Результаты данной работы вносят вклад в разработку более эффективных и точных CRISPR/Cas систем для использования в науке и медицине.



Санкт-Петербургский
государственный
университет



*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №20-14-00148,
а также средств гранта Санкт-Петербургского государственного
университета (проекты №93025998 и 92561695).*



Анализ специфичности расщепления целевой ДНК нуклеазой Cas12

Чиринская А.В.¹, Сопова Ю. В.^{1,2}, Зелинский А.А.², Фотина А. С.¹, Маркова Е. В.¹, Леонова Е.И.¹

1. Центр трансгеноза и редактирования генома, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

2. Лаборатория биологии амилоидов, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

Системы геномного редактирования на основе CRISPR/Cas нуклеаз предназначены для направленного внесения изменений в ДНК и РНК различных организмов. К одним из наиболее известных и используемых в лабораторной практике ферментов относят нуклеазы семейства Cas12. Среди представителей данного семейства нуклеаз можно выделить Cas12a, Cas12b, Cas12f (ранее называемая Cas14) и другие. В настоящее время происходит стремительное развитие основанных на CRISPR/Cas-системах технологий редактирования генома и транскриптома, систем визуализации, а также диагностики и терапии наследственных заболеваний. Было показано, что узнавание ДНК нуклеазами семейства Cas12 является PAM-зависимым и более точным, чем для нуклеазы Cas9. Считается, что Cas12a узнает PAM следующего вида: 5'-TTTV-3' (V=A, C или G). Помимо целевой активности в отношении двунитевой ДНК активированная нуклеаза Cas12 проявляет неспецифическую активность в отношении однонитевой ДНК. Это свойство было использовано в системе детекции вируса COVID-19 с использованием нуклеазы Cas12a.

В нашей лаборатории была успешно наработана и очищена нуклеаза Cas12a из организма *Lachnospiraceae bacterium* (LbCas12a). Был проведен анализ специфичности узнавания нуклеазой целевой последовательности ДНК путем проверки наличия внесения разреза в целевой продукт. Было показано, что при наличии однонуклеотидных замен в направляющей РНК взаимодействие было во многом неспецифичным: во многих случаях было продемонстрировано расщепление целевой ДНК.

Нами впервые было показано, что Cas12a узнает PAM 5'-TTAA-3'. Мы сравнили целевую активность фермента LbCas12a в присутствии двух вариантов PAM (5'-TTTA-3' и 5'-TTAA-3'). Мы также проанализировали специфичность взаимодействия Cas12a с целевой ДНК в случае PAM 5'-TTAA-3' и обнаружили, что полноценное расщепление целевой ДНК идет только в



пробе с отсутствием неспаренностей между направляющей РНК и целевой ДНК. Таким образом, использование альтернативного РАР значительно увеличивает специфичность взаимодействия фермента LbCas12a с целевой ДНК.

Результаты данного исследования открывают перспективы для дальнейшего улучшения технологии CRISPR/Cas в целях использования в медицине и лабораторной практике.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №20-14-00148,
а также средств гранта Санкт-Петербургского государственного
университета (проекты №93025998 и 92561695).*



Изучение экспрессии TAAR5 методами гистохимии

Шемякова Т.С.¹, Меркульева Н.С.², Вещицкий А.А.², Гайнетдинов Р.Р.¹

1. Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

2. Лаборатория нейроморфологии, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

Следовые амины (TAs) и их рецепторы (TAARs) уже более 20 лет являются объектом высокого интереса у исследователей, однако, прогресс в их изучении осложняется некоторыми трудностями: 1) низким уровнем экспрессии TAs, 2) внутриклеточной локализацией рецепторов, 3) широкими параметрами лигандов (1). К настоящему моменту известно, что TAARs (кроме TAAR1), экспрессируются в обонятельном эпителии и участвуют в детекции запахов, функционируя как ольфакторные рецепторы (2, 3). Наши недавние исследования также продемонстрировали локализацию TAAR5 за пределами обонятельных долей, в структурах лимбической системы и в нейрогенных областях головного мозга мыши (4, 5), что указывает на более широкие функции TAARs. Целью данной работы было продолжить изучение экспрессии TAAR5 в головном мозге мыши, используя методы гистохимии.

Мы использовали вставку в ген *taar5* репортерного гена *LacZ*, кодирующего бактериальный фермент бета-галактозидазу, активность которого можно визуализировать с помощью методов гистохимии (при взаимодействии бета-галактозидазы с субстратом X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид) осаждается синий продукт реакции). Это позволило подтвердить экспрессию TAAR5 в мозге мышей, а также определить структуры, в которых локализуется TAAR5. Экспрессия TAAR5 была подтверждена не только в гломерулярном, внутреннем плексиформном, митральном слоях основной обонятельной луковицы и в вспомогательной обонятельной луковице, но также и в лимбических областях мозга: пириформной коре, кортикальной амигдаларной области (ядрах миндалевидного комплекса), гиппокампе (полях CA1, CA2, CA3, пирамидальном слое), энторинальной коре, ядрах таламуса и гипоталамуса.

Доказательство экспрессии TAAR5 в обонятельной и лимбической системе мозга наводит на мысль об участии TAAR5 в регуляции эмоционального фона. Эту гипотезу подтверждают данные о поведении мышей,



нокаутных по *taar5*, которые демонстрировали пониженный уровень тревожности и депрессивно-подобного поведения (5). ТAs метаболически тесно связаны с классическими нейромедиаторами, в частности, дофамином и серотонином, в низких концентрациях являясь модулятором их активности, что обуславливает контроль настроения и общего эмоционального фона (6, 7). Наличие экспрессии ТААР5 в моноаминергических системах мозга предполагает их роль в модуляции нейротрансмиссии моноаминов, что делает их привлекательной мишенью для терапии психических и нервных заболеваний.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-30008.

1. Lindemann L. et al. Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors // *Genomics*. – 2005. – Vol. 85. – №. 3. – P. 372-385.
2. Liberles S. D. Trace amine-associated receptors are olfactory receptors in vertebrates // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 1170. – №. 1. – P. 168-172.
3. Liberles S. D., Buck L. B. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium // *Nature*. – 2006. – Vol. 442. – №. 7103. – P. 645-650.
4. Efimova E. V. et al. Increased dopamine transmission and adult neurogenesis in trace amine-associated receptor 5 (TAAR5) knockout mice // *Neuropharmacology*. – 2021. – Vol. 182. – P. 108373.
5. Espinoza S. et al. Trace amine-associated receptor 5 provides olfactory input into limbic brain areas and modulates emotional behaviors and serotonin transmission // *Frontiers in molecular neuroscience*. – 2020. – Vol. 13. – P. 18.
6. Burchett S. A., Hicks T. P. The mysterious trace amines: protean neuromodulators of synaptic transmission in mammalian brain // *Progress in neurobiology*. – 2006. – Vol. 79. – №. 5-6. – P. 223-246.
7. Khan M. Z., Nawaz W. The emerging roles of human trace amines and human trace amine-associated receptors (hTAARs) in central nervous system // *Biomedicine & Pharmacotherapy Biomedecine & Pharmacotherapie*. – 2016. – Vol. 83. – P. 439-449.



Ранние структурные патологии в митохондриях дофаминергических нейронов при условном выключении гена *Mfn2*

Шишков А.Г.¹, Нифантова Н.В.¹, Сопова Е.С.¹, Шупляков О.В.^{1,2}.

1. Лаборатория биологии синапсов, Институт трансляционной биомедицины, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

2. Отдел нейронаук, Каролинский Институт, г. Стокгольм, Швеция

При многих генных мутациях, приводящих к болезни Паркинсона (БП), в дофаминергических нейронах (ДН) среднего мозга наблюдается митохондриальная дисфункция. Одним из белков, нарушение функции которого связывают с БП, является митофузин 2 (*Mfn2*). *Mfn2* представляет собой трансмембранный белок, расположенный во внешней митохондриальной мембране. Он является важным компонентом процесса слияния митохондрий. Ранее для исследования роли этого белка в развитии БП, использовался метод нокаута гена *Mfn2*, однако у нокаутных мышей наблюдались нарушения эмбрионального развития и формирования ДН, что усложняло оценку результатов экспериментов. Цель нашей работы состояла в том, чтобы исследовать, какие ранние структурные изменения возникают в митохондриях при условном выключении гена *Mfn2* в сформированных ДН.

Для экспериментов использовали линию мышей, в ДН которых может запускаться экспрессия *Cre*-рекомбиназы, а ген *Mfn2* фланкирован loxP сайтами. Введение тамоксифена в этой модельной системе позволяет инактивировать ген *Mfn2* у взрослых мышей в сформированных ДН. Препараты среднего мозга животных исследовали через 3, 6 и 9 недель после введения тамоксифена с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (ТЭМ) и сканирующего электронного микроскопа с фокусированным ионным пучком (ФИП-СЭМ). 3D-анализ структуры митохондрий в ДН черной субстанции проводили с помощью компьютерной программы Amira.

Данные ТЭМ показали, что инактивация *Mfn2* приводит к изменению формы митохондрий на ранних этапах (3 недели) после выключения гена. Профили органелл на срезах принимают сферическую форму и происходит нарушение регулярной организации крист внутренней мембраны. На более поздних этапах после инактивации *Mfn2* (6, 9 недель) органеллы увеличиваются в размере, наблюдается нарушение целостности внешней и внутренней мембраны митохондрий. Помимо изменения формы органелл,



микроскопический анализ также выявил наличие профилей округлой формы с двойной мембраной внутри митохондрий. Данные структуры не наблюдались в контрольных препаратах.

Чтобы более детально исследовать морфологию и организацию этих структур, мы использовали ФИП-СЭМ. 3D-анализ структуры митохондрий показал, что наблюдаемые мембранные структуры относятся к системе внутренней мембраны митохондрий. Мы обнаружили, что при выключении *Mfn2* митохондриальные кристы принимают форму «чаши». Такая морфология внутренней мембраны объясняет наличие структур округлой формы внутри митохондрий на ультратонких срезах. Кроме того, мы обнаружили, что некоторые кристы разветвляются и образуют цепочки, состоящие из множества сферических структур, соединенных узкими перемычками.

Полученные результаты позволяют предполагать, что *Mfn2* связан с белковыми комплексами, стабилизирующими структуру внешней и внутренней мембран митохондрий. Нарушение его функции приводит к ранним патологическим изменениям в организации крист. Наши исследования указывают, что восстановление функций этого белка при мутациях *Mfn2* и нарушениях взаимодействий *Mfn2* будет иметь важное значение для терапии болезни Паркинсона.

*Исследования финансировались из проекта 93026688 СПбГУ
и грантов Российского научного фонда 21-15-00227 и Шведского
Научного Совета.*