

**Федеральное агентство научных организаций
(ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
УЧЕБНО-НАУЧНЫЙ ЦЕНТР**

**XXIX зимняя молодежная научная школа
«ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»**

Москва, 7-10 февраля 2017 г.

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

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

**Школа проводится при поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований**

Составители: Стукачева Е.А., Шереметьева Э.В.

Компьютерная верстка: Черняев Г.А.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

Отпечатано на полиграфическом участке ИБХ РАН

Печать офсетная. Печ. л. 12,47. Тираж 200 экз.

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 2017 г.

**ПОИСК МОДЕЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ FAP В КАЧЕСТВЕ МИШЕНИ ПРИ
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ**

Антонова Д.В., Плешкан В.В., Свердлов Е.Д.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: tyulkina.dina@mail.ru

Белок активации фибробластов (fibroblast activation protein, FAP) избирательно экспрессируется в процессе эмбриогенеза, в ткани заживающих ран, а также в опухолевых клетках и опухоль-ассоциированных фибробластах (ОАФ) некоторых типов злокачественных опухолей, включая рак поджелудочной железы. Повышенная специфическая экспрессия FAP в ОАФ коррелирует с опухолевой прогрессией, что делает его привлекательной терапевтической мишенью. Но ОАФ труднодоступны как воспроизводимо возобновляемый клеточный материал, что затрудняет проведение исследований механизмов функционирования и подавления FAP.

С целью выявления клеточных линий, для которых характерна экспрессия FAP, определен уровень транскрипции гена FAP методом ПЦР в режиме реального времени в 25 клеточных линиях (в линиях рака поджелудочной железы - PANC-1, MIA PaCa-2, AsPC-1, Capan-2, VxPC-3; рака легкого - Calu1, A549, NCI-H1299, NCI-H460; рака печени - HepG2; лимфопролиферативных заболеваний - HL-60, Jurkat, Daudi, Raji; саркомы - Tera1, Tera2; саркомы - RMS 13, SJSA-1, HT-1080; нейробластомы - NGP-127, IMR-32; меланомы - A375; эпидермоидной карциномы - A431, в линии эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC и эмбриональной почки HEK-293) и в 8 первичных культурах опухолевой стромы рака поджелудочной железы и легкого. Наиболее высокий уровень транскрипции обнаружен в линиях RMS 13, SJSA-1 и NGP-127, где он сопоставим с транскрипцией в ОАФ легкого. Проведен вестерн-блот анализ двух образцов культивированных фибробластов (IVP-9TS, ICL-7NS), двух клеточных линий, в которых была обнаружена экспрессия FAP (RMS 13, NGP-127), 4 клеточных линий рака поджелудочной железы (PANC-1, VxPC-3, AsPC-1 и MIA PaCa-2) и линии HT-1080, для которой ранее показано отсутствие белка FAP.

Поскольку FAP представляет собой сериновую протеазу, модифицирующую внеклеточный матрикс, крайне важным является ее трансмембранное расположение, позволяющее наиболее эффективно выполнять свои ферментативные функции. Поэтому для использования в качестве модели необходимы клеточные линии с поверхностной локализацией FAP. Следующим этапом является определение локализации FAP в линиях RMS 13, SJSA-1 и NGP-127 для подтверждения возможности их использования в качестве моделей для противоопухолевой терапии.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 14-50-00131.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ПРЕДСКАЗЫВАЮТ ВОЗНИКНОВЕНИЕ СПОНТАННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШИ

Аронов Д.А., Семушина С.Г., Моисеева Е.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: aronov.mml@gmail.com, chem@biol.ru

Оригинальные линии мышей BLRB и BYRB характеризуются высокой частотой естественно (спонтанно) возникающего рака молочной железы (РМЖ), воспроизводящего практически все патоморфологические типы РМЖ человека. Иммунологические характеристики опухолеассоциированных лейкоцитарных инфильтратов самок этих линий схожи с аналогичными образованиями человека, тогда как роль изменения показателей иммунной системы самого реципиента по мере возникновения РМЖ ещё не изучена. Целью данной работы было 1) разработать методику прижизненного индивидуального анализа иммунологических показателей образа периферической крови мыши с помощью трехцветной проточной цитометрии и 2) оценить их прогностический потенциал в спонтанной мышшиной модели РМЖ человека.

Материалы и методы. У интактных самок BLRB и BYRB (n=81, возраст 55,2±2,0 нед.) без видимых проявлений РМЖ на день 0 были прижизненно взяты образцы крови для цитологического анализа и измерения иммунологических показателей (CD45 (PerCP), CD4 (FITC), CD8 (FITC), CD19 (PE), CD25 (PE), NK1.1 (PE), CD11b (FITC), F4/80 (PE)) методом проточной цитометрии. Далее, в течение 6 месяцев ежедневно оценивали выживание самок, еженедельно осуществляли поиск новых опухолей.

Результаты. В течение 6 месяцев РМЖ был выявлен у 22 самок (возраст 72,7±3,0 нед.), в то время как у 23 самок (возраст 80,8±2,7 нед.) РМЖ не был обнаружен. Исходный уровень моноцитов (CD11b⁺F4/80⁺SSC^{int}) в крови самок, у которых в дальнейшем появились опухоли, был выше на 34% (p=0,02), а уровень CD4⁺ Т-хелперов - ниже на 11% (p=0,044) по сравнению с самками, у которых РМЖ не был обнаружен. Средняя продолжительность жизни (СПЖ) опухоленосителей после выявления РМЖ составила 7,4±0,6 нед.; при этом 55% (12/22) самок прожили дольше СПЖ. Исходный уровень CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов в крови долгоживущих самок был на 16% ниже (p=0,007), чем у самок, проживших меньше СПЖ.

Выводы. Иммунологические показатели периферической крови самок высококачественных линий мышей обладают прогностической ценностью: повышенный уровень моноцитов и сниженный уровень CD4⁺ Т-хелперов был ассоциирован с развитием РМЖ. Исходный уровень CD4⁺CD25⁺ активированных Т-хелперов в крови интактных самок предсказывал продолжительность их жизни после возникновения РМЖ.

ПЕРЕДАЧА ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СИГНАЛА ПРИ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ ФЕОХРОМОЦИТОМЫ PC12 N-АЦИЛДОФАМИНАМИ

Ашба А.М., Акимов М.Г., Грецкая Н.М., Безуглов В.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: alyafonya@mail.ru

N-Ацилдофамины (NADA) - биогенные конъюгаты дофамина с длинноцепочечными жирными кислотами. NADA индуцируют гибель раковых клеток различного гистологического происхождения с полублетальными дозами в диапазоне 2-50 мкМ (установлено с помощью МТТ и LDH-тестов). Активность зависит от структуры остатка жирной кислоты и модификации дофамина, и является специфической. NADA проявляют свойства агонистов рецепторов каннабиноидно-ванилоидной системы, однако молекулярная мишень NADA, обеспечивающая индукцию гибели клеток, до сих пор неизвестна. Цель данной работы - идентифицировать рецептор NADA в клеточной линии феохромоцитомы PC12 и изучить пути передачи внутриклеточного сигнала при индукции клеточной гибели.

Мы установили, что мишенью NADA является рецептор non-CB1/CB2 GPR55 (подтверждено с помощью фармакологической блокады под действием ингибитора O-1918 и известных агонистов, а также путем нокдауна shRNA). Этот рецептор передает сигнал на фосфолипазу C (установлено, с помощью использования специфического ингибитора и измерения уровня NO), которая генерирует инозитрифосфат (IP3), вызывающий высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных пулов через IP3-рецептор (специфический ингибитор рецептора, измерение уровня NO). Ca²⁺ (измерение концентрации кальция, использован хелатор кальция, анализ экспрессии мРНК nNOS на фоне хелатора) через кальмодулин (ингибитор кальмодулина) и протеинкиназу CaMKIV (ингибитор CaMKIV) активирует фактор транскрипции CREB (измерен уровень АФК на фоне ингибитора CREB, анализ экспрессии мРНК nNOS на фоне ингибитора), который обеспечивает экспрессию нейрональной NO-синтазы (анализ экспрессии мРНК nNOS, iNOS, eNOS, использование ингибитора nNOS), последующую генерацию NO (измерение уровня NO, использование хелатора NO) и АФК (измерение АФК, ингибирование цистеином и аскорбатом для подтверждения окислительного стресса). Далее сигнал через чувствительную к АФК протеинкиназу ASK1 передается на протеинкиназу JNK (установлено с помощью ингибиторов данных киназ) и происходит запуск внутреннего пути апоптоза (измерение активности каспаз, использование панкаспазного и ингибитора аутофагии, анализ фрагментации ДНК, с помощью флуоресцентного красителя ApoTRACE и окраски аннексином) с активацией каспаз 9 и 3. В дополнение к данному пути зафиксированы дополнительные ветви с участием протеинкиназы G, гуанилилциклазы, белка Ras и калпаина (установлено с помощью специфических ингибиторов, измерения NO и АФК на фоне этих ингибиторов), которые предположительно служат для усиления и дублирования сигнала.

Таким образом, нам впервые удалось полностью и детально охарактеризовать передачу сигнала NADA при индукции клеточной смерти.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ № 16-04-00729а.

ВЫЯВЛЕНИЕ ФРАГМЕНТА РЕЦЕПТОРА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ, ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Баласанянц С.М.¹, Волкова Т.Д.¹, Зудина Ю.С.¹, Камынина А. В.¹, Короев Д.О.¹, Филатова М.П.¹, Александрова И.Ю.², Нестерова И.В.², Самохин А.Н.², Бобкова Н.В.², Вольпина О.М.¹

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

²Институт биофизики клетки РАН, Пущино
Электронный адрес: balasanjanz@gmail.com

Рецептор конечных продуктов гликозилирования (RAGE) находится на поверхности нейронов и клеток глии и играет важную роль в развитии болезни Альцгеймера (БА). RAGE взаимодействует со множеством лигандов, к которым относят значимые при патогенезе БА β -амилоид и белок S100B. Это позволяет утверждать, что рецептор RAGE является перспективной мишенью для терапии этого заболевания. Ранее нами была показана способность фрагмента RAGE(60-76) эффективно восстанавливать пространственную память животных в экспериментальной модели БА при интраназальном введении.

Целью настоящей работы является выявление наиболее короткого участка пептида RAGE(60-76), ответственного за его терапевтический эффект. Для этого была синтезирована серия укороченных фрагментов пептида RAGE(60-76), полностью перекрывающих его последовательность. Активность фрагментов изучали на бульбэктомированных (БЭ) мышах, проявляющих признаки спорадической формы БА. Показано, что только фрагмент (60-70) восстанавливает пространственную память БЭ животных. Выявлено, что фрагменты, у которых отсутствуют два первых N-концевых остатка пептида RAGE (60-76), не проявляют биологическую активность. При исключении из последовательности фрагмента (60-70) C-концевых остатков пептиды перестают обладать терапевтической активностью.

Также проведено исследование морфофункционального состояния головного мозга БЭ мышей после интраназального введения пептида (60-76) и его фрагментов. Выявлено, что только введение пептидов (60-76) и (60-70) достоверно восстанавливает число нормальных нейронов, а также сокращает число нейронов с такими патологиями, как пикноз, кариолизис и цитолиз до нормального физиологического уровня. Введение всех остальных изученных пептидов не улучшает состояние нейронов мозга.

Таким образом, пептид RAGE(60-70) является наиболее коротким биологически активным фрагментом рецептора, способным восстанавливать пространственную память животных и предотвращать патологические изменения в нейронах головного мозга.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ № 15-04-01360а.

РАЗЛИЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДВУХ ЛИГАНДОВ ОДНОГО РЕЦЕПТОРА: АДИПОНЕКТИН И ЛИПОПРОТЕИДЫ КАК ЛИГАНДЫ ГФИ-ЗАЯКОРЕННОГО РЕЦЕПТОРА Т-КАДГЕРИНА

Балацкая М.Н.¹, Шаронов Г.В.², Ткачук В.А.¹

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

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: m.balatskaya@gmail.com

Некоторые гликозилфосфатидилинозит(ГФИ)-заякоренные белки, несмотря на отсутствие трансмембранного и цитоплазматических доменов, по праву могут считаться рецепторами, поскольку не только специфично связываются со своими лигандами, но и запускают внутриклеточную сигнализацию. В нашей лаборатории ГФИ-заякоренный белок Т-кадгерин был обнаружен как рецептор липопротеидов низкой плотности(ЛНП), который опосредует активацию фосфолипазы С, фосфоинозитидный обмен и увеличение цитоплазматической концентрации ионов кальция $[Ca^{2+}]$. Позже было обнаружено взаимодействие Т-кадгерина с адипонектином, ключевым гормоном жировой ткани, регулирующим чувствительность к инсулину и снижающим риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний. Таким образом, один и тот же рецептор - Т-кадгерин - способен связываться с двумя лигандами, которые на физиологическом уровне имеют противоположные эффекты на развитие атеросклероза, ожирения и метаболического синдрома. Является ли это следствием различной внутриклеточной сигнализации двух лигандов через один рецептор было проверено в ходе настоящей работы.

Исследование проводилось на первичных гладкомышечных клетках, а также клеточной линии НЕК293 с гиперэкспрессией Т-кадгерина и контрольными клетками, где этот белок не экспрессируется. Изменение внутриклеточного $[Ca^{2+}]$ регистрировалось в реальном времени при помощи флуоресцентного зонда Fura-2 на одиночных клетках. Оказалось, что адипонектин высокомолекулярной формы не вызывает увеличения внутриклеточного $[Ca^{2+}]$ в отличие от ЛНП. Более того, адипонектин способен ингибировать гормоноподобный эффект ЛНП, уменьшая кальциевую сигнализацию, при совместном воздействии двух лигандов. Эти результаты могут объяснить нарушения миграции и пролиферации гладкомышечных клеток при изменении соотношения ЛНП и адипонектина, которые происходят при ожирении и других патологических состояниях. Мы предполагаем, что различное действие двух крупных лигандов (ЛНП - 3000 кДа, адипонектина высокомолекулярной формы - до 540 кДа) реализуется за счёт разной степени олигомеризации ГФИ-заякоренного рецептора Т-кадгерина.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 14-24-00086).

ПОЛУЧЕНИЕ ДИСКРЕТНЫХ ДНК-НАНОСТРУКТУР ГИБРИДИЗАЦИЕЙ РАЗВЕТВЛЕННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИД- ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ КОНЬЮГАТОВ

Брылёв В.А.¹, Коршун В.А.¹, Зацепин Т.С.², Устинов А.В.¹

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

²Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва
Электронный адрес: v.brylev@yandex.ru

Для самосборки ДНК-наноструктур [1] в последние годы стали применять синтетические олигонуклеотид-олигонуклеотидные конъюгаты [2]. Недавно нами разработан эффективный метод получения таких конъюгатов [3]. Из полиазидов и алкин-модифицированных олигонуклеотидов (с уникальными последовательностями) с помощью медь-катализируемой реакции циклоприсоединения в среде вода-ДМСО получены разветвленные олигонуклеотидные конъюгаты. В случае протяженных олигонуклеотидов клик-реакция протекала не до конца. Повысить выход целевых продуктов полного присоединения удалось при проведении реакции в смеси вода-формамид и нагревании. Полученные конъюгаты V- и Y-образной формы применялись для получения дискретных самоорганизующихся структур.

Изучено влияние различных факторов (состав буфера, концентрации олигонуклеотидов) на состав продуктов гибридизации. Анализ реакционных смесей нативным электрофорезом в полиакриламидном геле и прокраска красителями SYBR Green I или бромистым этидием показали наличие двухцепочечных фрагментов в виде набора пятен, соответствующих дискретным ДНК-наноструктурам. Была отмечена зависимость размера образующихся структур от состава исходных блоков.

Литература

1. N.C. Seeman Annu. Rev. Biochem. 2010, 79, 65-87.
2. I. Eryazici et al. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 7450-7458.
3. A.I. Ponomarenko et al. Tetrahedron 2016, 72, 2386-2391.

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЛИПОСОМЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ В МОДЕЛЯХ *IN VITRO*

Гилёва А.М.¹, Петрунин А.В.², Власова К.Ю.², Кондря У.Р.³,
Сарычев Г.А.³, Буданова У.А.³, Шмендель Е.В.³, Колоскова О.О.³,
Себякин Ю.Л.³, Мажуга А.Г.³, Клячко Н.Л.², Марквичева Е.А.¹

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

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

³Московский технологический университет, Москва
Электронный адрес: sumina.anastasia@mail.ru

Разработка новых эффективных противораковых препаратов является приоритетной задачей биомедицины. Инкапсулирование лекарств позволяет уменьшить побочные эффекты и обеспечить их адресную доставку в раковые клетки, как за счет EPR эффекта (пассивная доставка), так и с помощью векторов, связывающихся с рецепторами только раковых клеток (активная доставка).

Целью работы была разработка модифицированных липосом и исследование их цитотоксичности в модели *in vitro*. Получено три новых типа модифицированных липосом. Первый тип - липосомы с контролируемым высвобождением препарата под действием низкочастотного негреющего магнитного поля. Липосомы получали из яичного лецитина и холестерина с добавлением наночастиц магнетита. Два других типа представляют собой катионные липосомы с модифицированной поверхностью. Положительный заряд на поверхности таких липосом позволяет им быстрее проникать через клеточную мембрану. В первом случае путем введения в состав липидов кремний-органических соединений были получены керасомы (липосомы с "остеклованной" поверхностью, которая обеспечивает пролонгированное высвобождение лекарства). Во втором случае поверхность липосом модифицировалась фолиевой кислотой, эффективно связывающейся с фолатными рецепторами на мембранах раковых клеток, что позволяет осуществить активную адресную доставку препарата. Синтез катионных липопептидов осуществлялся по разработанной нами "блочной" схеме, обладающей рядом преимуществ перед использованием коммерчески доступных липидов. В качестве исходных структурных элементов был выбран ряд природных аминокислот, высших жирных спиртов, силоксановые производные и фолиевая кислота, а в качестве модельного противоопухолевого препарата - доксорубин. Были исследованы физико-химические свойства липосом (размер, ζ-потенциал, стабильность, кинетика высвобождения лекарств и др). Цитотоксичность липосом изучали на клетках MCF-7; MCF-7/DXR (линия, устойчивая к доксорубину) и HeLa с помощью МТТ-теста. Эффективность проникновения и накопление частиц в клетках исследовали методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии в моделях 2D (монослойная культура клеток) и 3D (мультиклеточные опухолевые сфероиды).

**ЭКСПРЕССИЯ микроРНК hsa-mir-5096 В КЛЕТКАХ HeLa
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИНИГЕНА TurboGFP**

Даянова Л.К., Патрушев Л.И.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: l.daianova@yandex.ru

МикроРНК (миРНК) - короткие некодирующие РНК длиной 21-24 нт, половина из которых локализована в интронах - играют важную роль в регуляции экспрессии эукариотических генов. Нарушение их экспрессии часто ассоциировано с заболеваниями человека. Целью данных исследований является поиск новых миРНК в интронах генов протромбина, а также природных антикоагулянтов, протеина С и протеина S, как возможных дополнительных регуляторов процесса свертывания крови человека. Компьютерный анализ последовательностей интронов вышеупомянутых генов с использованием базы данных миРНК miRBase выявил шесть потенциальных предшественников миРНК, высокоомологичных известному предшественнику миРНК человека hsa-mir-5096. При этом предполагаемые миРНК отличались от известной миРНК hsa-mir-5096 только одним нуклеотидом. Для подтверждения функциональности обнаруженных последовательностей нами в плазмидном векторе под контролем цитомегаловирусного промотора был сконструирован миниген TurboGFP, содержащий короткий интрон длиной в 61 п.н., содержащий все необходимые сайты сплайсинга, а также три уникальных сайта рестрикции для клонирования анализируемых последовательностей. Наличие такого мини-интрона инактивировало TurboGFP. В то же время потенциальный предшественник миРНК hsa-mir-5096 длиной ~100 п.н., введенный в состав мини-интрона, вместе с ним эффективно вырезался из пре-мРНК в трансфицированных клетках HeLa в результате сплайсинга, что восстанавливало функциональность (флуоресценцию) TurboGFP. Это явление было детально исследовано с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии, а процессинг пре-РНК с образованием зрелой миРНК hsa-mir-5096 подтвержден с помощью ОТ-ПЦР. Кроме того оказалось, что клетки HeLa экспрессируют эндогенную hsa-mir-5096, что необходимо учитывать при анализе процессинга предшественников миРНК с использованием полученного минигена. В целом, в результате проведенных исследований нами создана новая эффективная система анализа процессинга предшественников миРНК в трансфицированных клетках человека.

**ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ α -СПИРАЛЬНОГО
АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА СМАР-28 ИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ
КОЗЫ *CAPRA HIRCA***

Емельянова А.А., Кузьмин Д.В., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: annaemelyan@gmail.com

Разработка новых противоопухолевых препаратов на основе антимикробных пептидов (АМП) является одной из перспективных стратегий борьбы с онкологическими заболеваниями. Известно, что некоторые АМП обладают способностью селективно воздействовать на цитоплазматическую мембрану опухолевых клеток и мембрану митохондрий. Нами проведено исследование цитотоксического эффекта α -спирального антимикробного пептида СМАР-28 из лейкоцитов козы *Capra hircus*. Пептид СМАР-28 имеет молекулярную массу 3365 Да и обладает основными свойствами за счёт наличия пяти остатков лизина, четырёх остатков аргинина и двух остатков гистидина. Рекомбинантный пептид был получен методом гетерологической экспрессии в клетках *E. coli*. Изучение цитотоксического эффекта пептида проводилось *in vitro* на панели суспензионных и адгезионных опухолевых и нормальных клеточных линий с помощью МТТ-теста после инкубации в течение 48 ч. На линии острого промиелоцитарного лейкоза HL-60 значение IC_{50} составило 3,2 мкМ, а на нормальных лейкоцитах, выделенных из крови человека, - 4,6 мкМ. По результатам проведения стандартного гемолитического теста было установлено, что в данных концентрациях СМАР-28 мало токсичен для эритроцитов человека: в концентрации 3,2 мкМ пептид вызывал гемолиз 3% эритроцитов, а в концентрации 6,3 мкМ - 8% эритроцитов. На адгезионных опухолевых клеточных линиях человека и мыши в МТТ-тесте значение IC_{50} составило от 4,8 до 6,5 мкМ. Значение IC_{50} на нормальных клетках - фибробластах человека - составило 9,2 мкМ. На астроцитах человека в изучаемом диапазоне концентраций пептида (0,8-10,0 мкМ) доля мёртвых клеток в максимальной концентрации составила менее 50%. Таким образом, значения IC_{50} для нормальных клеток выше, чем для опухолевых, что свидетельствует об определенном уровне селективности действия пептида на опухолевые клетки. По сравнению с действием ранее изученных нами β -шипиленных АМП (ареницин, гомезин, тахиплезин) СМАР-28 токсичен для опухолевых и нормальных клеточных линий в более низких концентрациях, но при этом имеет менее выраженную гемолитическую активность. Таким образом, пептид СМАР-28 может быть рассмотрен в качестве нового прототипа противоопухолевого агента.

Исследование выполнено за счёт гранта РФФИ № 14-50-00131.

ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ НЕЙРОНОВ С КЛЕТОЧНЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ

Ермакова Ю.Г.¹, Ланин А.А.², Федотов И.В.², Шохина А.Г.¹, Кельмансон И.В.¹, Билан Д.С.¹, Богданова Ю.С.¹, Жёлтиков А. М.², Белоусов В.В.¹

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва
Электронный адрес: ermakova.iylia@yandex.ru

Термогенетика представляет метод активации клеток, при котором активация достигается за счет локального повышения температуры, регистрируемого термочувствительными каналами семейства TRP. В нашей работе мы провели активацию и регистрацию электрофизиологических характеристик нейронов, экспрессирующих TRPA1 инфракрасным (ИК) излучением совместно с температурным контролем образца с помощью оптоволоконной термометрии.

Подпороговое повышение температуры с помощью низкой мощности ИК-лазера приводило к подпороговой деполяризации нейронов; повышение температуры до пороговой ($27.8 \pm 0.6^\circ\text{C}$ для caTRPA1; $38.5 \pm 0.7^\circ\text{C}$ для eolTRPA1) приводило к возникновению одного потенциала действия (ПД) на один лазерный импульс. Ионный ток возникал в течение 1-2 мс с момента подачи стимула, ПД формировался в процессе 30-35 мс с начала активации, что сравнимо со скоростью работы светочувствительных опсинов. При импульсной стимуляции нейронов с частотой до 50 Гц наблюдалась генерация единичного ПД в ответ на каждый стимул, что говорит о способности TRPA1 декодировать различные стимулирующие частоты.

Также была проведена *in vivo* активация 2-х дневных личинок Zebrafish, экспрессирующих TRPA1 в соматосенсорных нейронах. При активации личинки локальным ИК излучением 1440 нм до пороговой температуры в течение 288 ± 8 мс личинка демонстрировала поведение избегания. Скорость и эффективность стимуляции зависела от мощности ИК-излучения, стимуляция мощностью 30 мВ приводила к активации 93% экспрессирующих TRPA1 личинок, при практически полном отсутствии ответа у контрольных личинок.

Таким образом, мы продемонстрировали, что TRPA1 змей являются универсальным инструментом, пригодным для модуляции активности различных биологических систем, а также описали кинетические характеристики работы TRPA1 двух видов змей.

HLA-DR КАК МАРКЕР ОСОБОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НК-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Ерохина С.А., Стрельцова М.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И.

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

Электронный адрес: sonya.erokhina@gmail.com

В норме в периферической крови человека содержится минорная субпопуляция НК-клеток, экспрессирующих HLA-DR. Показано, что под действием IL-2 доля этой субпопуляции возрастает. Также имеются данные о повышенном уровне HLA-DR⁺ НК-клеток в тканях и периферической крови на фоне некоторых патологических состояний. Функциональная значимость этой молекулы на НК-клетках до сих пор находится на стадии обсуждения: несколько работ указывают на способность НК-клеток использовать HLA-DR для антиген-презентации молекул, распознанных НК-клеточными рецепторами, в других работах HLA-DR относят к маркерам активации или пролиферации НК-клеток. Целью данной работы являлось изучение фенотипических особенностей, развития, функциональной активности HLA-DR-позитивных НК-клеток, выделенных *ex vivo* и/или полученных в модельной системе путем стимуляции IL-2 и клетками K562, экспрессирующими мембраносвязанный IL-21 (K562-mbIL21).

Анализ экспрессии HLA-DR на разных стадиях дифференцировки свежесыведенных НК-клеток показал, что наибольшая доля клеток HLA-DR⁺ представлена в менее дифференцированной субпопуляции CD56^{bright}, а наименьшая - в сравнительно более зрелой субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺. Однако у некоторых индивидов в крови был заметно повышен уровень НК-клеток CD56^{dim}CD57⁺HLA-DR⁺, которые в некоторых случаях также экспрессировали NKG2C. Такая комбинация поверхностных маркеров позволяет предположить связь экспрессии HLA-DR с разновидностью НК-клеток "памяти". Ранее нами было показано, что доля НК-клеток HLA-DR⁺ увеличивается в разы при стимуляции IL-2 и K562-mbIL21 в течение 6 дней (от в среднем 6% до 35-93% НК-клеток), даже в предварительно отсортированной субпопуляции HLA-DR⁺. Было высказано предположение, что увеличение доли происходит не только за счет пролиферации HLA-DR-позитивных клеток, но и за счет появления экспрессии HLA-DR *de novo*. Это было подтверждено в данной работе по результатам PCR-анализа мРНК альфа-субъединицы HLA-DR: у свежесыведенных HLA-DR-негативных НК-клеток данной мРНК не наблюдалось вовсе, тогда как на 6-й день стимуляции IL-2 и K562-mbIL21 экспрессия HLA-DR четко регистрировалась. Подобный популяционный сдвиг, возникающий в результате стимуляции указанными цитокинами, следует учитывать при разработке методов наращивания НК-клеток, например, с целью использования в адаптивной иммунотерапии.

Более детальный анализ отсортированных субпопуляций НК-клеток HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ показал, что HLA-DR-позитивные клетки, полученные после 6 дней стимуляции IL-2 и K562-mbIL21, характеризуются повышенной цитотоксичностью и продукцией IFN γ по сравнению с HLA-DR-негативными

клетками. Кроме того, клетки HLA-DR⁺ демонстрировали более высокую экспрессию LAMP-1, NKG2D, CD86, что тоже свидетельствует об их активированном статусе и интенсивной дегрануляции. Таким образом, экспрессия HLA-DR, по-видимому, ассоциирована с НК-клетками на ранних стадиях дифференцировки, или, наоборот, терминально дифференцированными, которые перешли в особое, функционально активное состояние в ответ на стимул.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-00836.

СВЕТОЗАВИСИМАЯ АКТИВАЦИЯ И ДЕТЕКЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ С ПОМОЩЬЮ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

Злобовская О.А., Саркисян К.С., Горбачев Д.А., Мишин А.С., Лукьянов С.А., Лукьянов К.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: olgazlob@yandex.ru

Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы, например, фототоксичный красный флуоресцентный белок KillerRed, являются перспективными инструментами с различными областями применения: от изучения влияния малых доз активных форм кислорода на клетку до прицельного уничтожения клеточных популяций. В данной работе мы протестировали новый вариант KillerRed, названный KillerOrange. Было показано, что KillerOrange и KillerRed обладают схожей фототоксичностью для клеток млекопитающих. Вместе с тем, для проявления фототоксичности эти два белка требуют облучения светом разной длины волны - синим или зеленым для KillerOrange и зеленым или оранжевым для KillerRed. Таким образом, KillerOrange и KillerRed могут быть использованы одновременно для индукции гибели двух различных клеточных популяций.

Для детекции клеточной гибели мы разработали новый генетически кодируемый сенсор активности каспазы-3 - ключевого участника апоптоза, вызванного как внешним, так и внутренним путем активации. Сенсор на основе Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) включал в себя дальнекрасный флуоресцентный белок mKate2 и около-инфракрасный флуоресцентный белок iRFP, соединенные линкером с сайтом расщепления каспазой-3 (DEVD). Благодаря тому, что дальнекрасный сенсор оставляет свободными синий, зеленый и желтый каналы детекции флуоресценции, одновременно с отслеживанием развития активности каспазы-3 мы наблюдали за перераспределением апоптотического белка Вах из цитоплазмы в митохондрии.

К нашему удивлению, ожидаемый из литературных данных порядок развития событий (сначала транслокация Вах, затем активация каспазы-3) наблюдался редко. Напротив, в большинстве клеток мы сначала детектировали активацию каспазы-3, а затем - перераспределение Вах между цитоплазмой и митохондриями. Таким образом, многоцветная флуоресцентная микроскопия с анализом событий в их развитии во времени в индивидуальных живых клетках позволила заключить, что тауростпорин может приводить к Вах-независимой активации каспазы-3.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

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

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

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

Электронный адрес: yuliya.s.ivanova@yandex.ru

Окислительно-восстановительный баланс клетки играет значительную роль в поддержании конформации белков, необходимой для их правильного функционирования. В связи с этим, в последнее время активно изучается вопрос об участии внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) в регуляции многих клеточных процессов. Для многих соматических стволовых и дифференцированных клеток человека уже доказано влияние АФК на клеточную пролиферацию. Однако, роль АФК в регуляции процесса самообновления эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), являющихся основой тканеобразования человека, пока не изучена. Важной особенностью ЭСК является специфическая для плюрипотентных клеток регуляция клеточного цикла, заметно отличающая их от соматических клеток-потомков. Кроме того, ЭСК обладают метаболическими характеристиками, соответствующими их исходному нахождению в бластоцисте, в условиях гипоксии. Таким образом, вопрос о специфическом редокс-статусе клеток и его влиянии на пролиферацию ЭСК является нетривиальным. Целью данной работы стало исследование влияния внутриклеточных АФК на динамику клеточного цикла ЭСК. Проведенные эксперименты показали, что уровень АФК коррелирует с процентным содержанием клеток в G2/M фазе клеточного цикла, а его направленное уменьшение при помощи антиоксидантов различной природы приводит к замедлению клеточного цикла и блокированию клеток при переходе из синтетической фазы в премитотическую. В работе проведен сравнительный анализ наблюдаемых эффектов в культурах ЭСК и их дифференцированных фибробластоподобных потомков и обсуждаются возможные молекулярные причины наблюдаемых отличий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-50-00068.

ПОЛУЧЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ГЛИКОПРОТЕИНУ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ДЛЯ ЭКСТРЕННОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Ильина Е.Н., Солопова О.Н., Алиев Т.К., Ларина М.В., Долгих Д.А., Свеишников П.Г., Кирпичников М.П.

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

Электронный адрес: Ekaterina.iljina.7@yandex.ru

Бешенство является одним из самых смертоносных инфекционных заболеваний, летальность которого приближается к 100%. Известно, что полностью человеческие терапевтические антитела против вируса бешенства являются перспективным средством экстренной профилактики заболевания.

Данная работа направлена на получение человеческого рекомбинантного антитела против вируса бешенства. В качестве альтернативы использования фагового дисплея для селекции человеческих иммуноглобулинов в работе применяли метод *in vitro* иммунизации, заключающийся в получении из периферической крови человека В-лимфоцитов, продуцирующих полностью человеческие антитела к гликопротеину вируса бешенства (ГПВБ).

В результате инкубации моноцитов из периферической крови человека с ГПВБ в присутствии цитокинов были получены антиген-презентирующие дендритные клетки. Получены гетерогридомы В-лимфоцитов человека и клеток мышинной миеломы путем соматической гибридизации с применением полиэтиленгликоля. Методом иммуноферментного анализа произведен отбор гибридных клонов, продуцирующих человеческие антитела против ГПВБ. Произведена наработка клеток гетерогридомом для выделения генов иммуноглобулинов и проведения иммунохимической характеристики продуцируемых антител.

Из клеток была выделена суммарная РНК, проведена обратная транскрипция и получена кДНК библиотека, на матрице которой с помощью ген-специфических праймеров были амплифицированы нуклеотидные последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей человеческого антитела к ГПВБ.

Для транзientной экспрессии данного антитела в клетках CHO была использована биплазмидная система на основе вектора pcDNA3.4. В процессе конструирования произведена замена исходного изотипа антитела IgM на IgG1. Проведено выделение полученного рекомбинантного антитела из среды культивирования, осуществлен анализ аффинности и специфичности к различным вакцинным штаммам бешенства.

Работа выполнялась при поддержке субсидии Министерства образования и науки Российской Федерации (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60716X0154).

РАЗНООБРАЗИЕ СОСТАВА И МЕТАБОЛИЗМА МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ГЛУБИННОЙ ПОДЗЕМНОЙ БИОСФЕРЫ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ, ВЫЯВЛЕННОЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛИЗА

Кадников В.В.¹, Франк Ю.А.²

¹ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Москва

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

Электронный адрес: vkadnikov@bk.ru

Одной из наименее изученных экологических ниш является подземная биосфера, в которой с увеличением глубины происходит нагрев пород и пластовых вод, что создает условия для развития термофильных микробных сообществ. Мы исследовали микробные сообщества подземных термальных вод региона Западной Сибири, доступных из двух нефтепоисковых скважин - ЗР в Парабельском районе и 1Р в пос. Белый Яр Томской области. Для характеристики микробных сообществ были использованы два подхода: (1) идентификация микроорганизмов на основе амплификации и пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК и (2) секвенирование полной метагеномной ДНК микробного сообщества. Нефтепоисковая скважина ЗР глубиной около 2,8 км вскрывает термальные воды (температура на выходе 46-51°C) в породах мезозойского периода. Таксономический анализ на основе 16S рРНК показал преобладание бактерий филума *Firmicutes*, представленных сульфат-редукторами родов *Desulfovibrio* (47% сообщества) и *Desulfotomaculum*, а также микроорганизмов, близких к роду *Thermacetogenium* (17%). Гидрогенотрофные метаногенные археи рода *Methanothermobacter* составляли около 24% сообщества. На основании анализа состава микроорганизмов и набора присутствующих в метагеноме генов можно сделать вывод о том, что сообщество термальных вод скважины ЗР характеризуется преимущественно хемолитоавтотрофным метаболизмом, в основе которого лежат процессы окисления водорода, сопряженные с восстановлением сульфата. Состав микробного сообщества второй скважины, расположенной вблизи поселка Белый Яр (температура воды 40-45°C, глубина 2,6 км), значительно отличался. Это сообщество было более разнообразно и включало бактерии *Firmicutes*, *Deltaproteobacteria*, *Chloroflexi* и *Nitrospira*, а также нескольких "некультивируемых" линий бактерий. Известные сульфат-редуцирующие бактерии составляли лишь небольшую часть сообщества, а археи практически отсутствовали. Метагеномный анализ позволил получить почти полные композитные геномы пяти доминирующих групп бактерий, включая некультивируемую линию OP8, и охарактеризовать пути их метаболизма и функциональную роль в сообществе.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-14-01016.

ВЛИЯНИЕ N- И C-КОНЦЕВЫХ МОДИФИКАЦИЙ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ТАХИПЛЕЗИНА I

Калашиникова М.Б., Емельянова А.А., Кузьмин Д.В., Пантелеев П.В., Баландин С.В., Овчинникова Т.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: thpcb92@mail.ru

Тахиплезин I - β-шипилечный антимикробный пептид (АМП), выделенный из гемоцитов мечехвоста *Tachypleus tridentatus*. Ранее при исследовании цитотоксических свойств рекомбинантных аналогов трех катионных β-шипилечных АМП - ариеницина-1, гомезина и тахиплезина I мы показали, что рекомбинантный тахиплезин I обладает наибольшей цитотоксичностью и специфичностью в отношении ряда опухолевых клеточных линий человека.

Учитывая то, что при системном введении под влиянием действия протеаз сыворотки крови снижается стабильность терапевтических агентов белковой природы, помимо рекомбинантного немодифицированного тахиплезина I, не имеющего защитных группировок, был исследован синтетический тахиплезин I с N- и C-концевыми модификациями. Тахиплезин I был защищен амидированием по N-концевому аминокислотному остатку и ацетилированием - по C-концевому. Необходимо отметить, что модифицированный синтетический тахиплезин I обладал более гидрофобными свойствами.

Цитотоксичность модифицированного и немодифицированного тахиплезина I оценивали с помощью МТТ-теста. Модифицированный синтетический тахиплезин I обладал более выраженными цитотоксическими свойствами как в отношении опухолевых, так и в отношении нормальных клеточных линий человека. Наличие N- и C-концевых модификаций значительно повысило гемолитическую активность тахиплезина I.

Кроме того, был изучен такой параметр как стабильность пептида в сыворотке крови человека. Модифицированный синтетический тахиплезин I практически не разрушался в свежей сыворотке крови человека по сравнению с немодифицированным рекомбинантным.

Таким образом, присутствие N- и C-концевых модификаций увеличивало как противоопухолевую активность, так и неспецифическую токсичность тахиплезина I. Введение N- и C-концевых модификаций оказывало положительное влияние на стабильность пептида в сыворотке крови. Более высокая активность модифицированного синтетического тахиплезина I предположительно объясняется его стабильностью, и использование данного пептида в качестве противоопухолевого агента представляется более перспективным.

Работа поддержана грантом ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы" (соглашение № 14.604.21.0104, уникальный идентификатор RFMEFI60414X0104).

ПРОСТАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ БТШ70

Килячус М.С., Шустова О.А., Гречихина М.В., Шкатова А.Н., Сапожников А.М.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: mskilyachus@gmail.com

Белки теплового шока 70 кДа (БТШ70) принадлежат к большому семейству внутриклеточных стресс-индуцируемых протеинов и обладают выраженными шаперонными свойствами. Внеклеточная форма этих протеинов способна оказывать модулирующее действие на различные звенья иммунной системы. В настоящее время ведутся активные поиски и уже предложены некоторые варианты практического использования препаратов рекомбинантных БТШ70 в клинике для диагностики и терапии. Очевидно, что применяемые в подобных исследованиях образцы белков должны быть предварительно протестированы на их функциональную активность. С этой целью в настоящее время чаще всего анализируется способность БТШ70 восстанавливать активность тех или иных ферментов, денатурированных нагреванием, т.е. тестируются шаперонные свойства полученных препаратов белка. Подобные тест-системы характеризуются сложностью и нестабильностью результатов оценки, поскольку в них требуется использование целого ряда важных вспомогательных компонентов, в частности препаратов клеточной биомассы, содержащих активную форму ко-шаперона БТШ40. В отличие от данного подхода к тестированию активности БТШ70 мы предлагаем оценивать протективные свойства препаратов этого белка в условиях внесения в клеточную культуру повреждающих факторов. Это предложение базируется на литературных данных и на результатах наших исследований, продемонстрировавших достоверное подавление процесса спонтанного и индуцированного апоптоза в клеточных культурах после внесения препаратов экзогенных БТШ70.

В данной работе мы провели предварительную оценку указанного подхода, вызывая клеточную гибель повреждающим действием разных доз этилового спирта в присутствии различных концентраций экзогенного рекомбинантного БТШ70. Оценку интенсивности клеточной гибели проводили с помощью проточной цитометрии и с помощью МТТ-анализа. В *in vitro* культурах ряда клеточных линий было установлено, что используемая тест-система позволяет достоверно выявлять протективную активность БТШ70, свидетельствующую об активности комплексного функционального профиля протестированных белков, необходимой для проникновения этих молекул во внутриклеточное пространство и для реализации в клетках широкого спектра своих протективных и шаперонных функций.

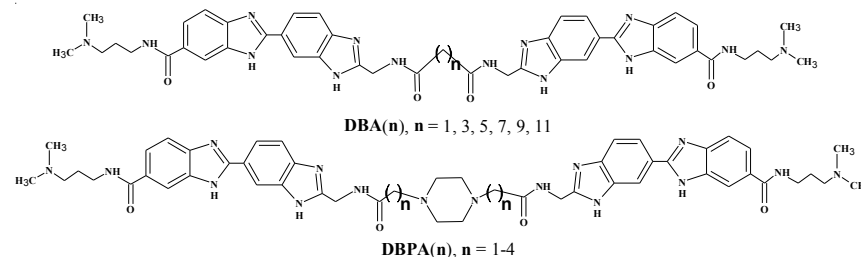
НОВЫЕ СЕРИИ ДИМЕРНЫХ БИСБЕНЗИМИДАЗОЛОВ - ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ДНК-СПЕЦИФИЧНЫХ УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ

Коваль В.С.¹, Жузе А.Л.², Олейников В.А.¹

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

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва
Электронный адрес: zhuze@imb.ac.ru

Синтезированы две новые серии флуоресцентных симметричных димерных бисбензимидазола **DBA(n)** и **DBPA(n)** способных избирательно связываться с АТ-богатыми последовательностями двухцепочечной ДНК (дцДНК) в узкой бороздке и содержащих концевые N,N-диметиламинопропилкарбоксамидные фрагменты (ДПФ). Данные группы, благодаря их более высокой гидрофильности и наличию ярко выраженных положительных зарядов, обеспечивают лучшую водорастворимость **DBA(n)** и **DBPA(n)** по сравнению с предыдущей серией узкобороздочных лигандов **DB(n)** [1]. Кроме того, ранее было установлено существенное увеличение ингибирующей активности димерных бисбензимидазолов, содержащих ДПФ, по отношению к интегразе ВИЧ-1 [2].



В спектрах поглощения **DBPA(n)** в присутствии дцДНК наблюдается гипохромный эффект и небольшой сдвиг полосы поглощения в длинноволновую область спектра по мере увеличения концентрации лиганда, что свидетельствует об образовании комплекса соединений с дцДНК. Кроме того, наличие комплекса подтверждается возрастанием флуоресценции **DBPA(n)** в присутствии ДНК. С помощью метода кругового дихроизма (КД), основанного на использовании холестерических жидкокристаллических дисперсий (ХЖКД) дцДНК была установлена локализация **DBPA(n)** в бороздке ДНК. На это указало появление положительной полосы в КД-спектре ХЖКД дцДНК в присутствии лиганда в области его поглощения. Положительный знак данного сигнала свидетельствовал о том, что хромофоры лиганда в комплексе располагаются под углом близким к 54° к спиральной оси дцДНК, что возможно только при локализации хромофоров в бороздке дцДНК.

Литература

1. Иванов А.А., Саянов В.И., Стрельцов С.А., Черепанова Н.А., Громова Е.С., Жузе А.Л. (2011) Биоорганическая химия, 37(4), 530-541.
2. Громько А.В., Саянов В.И., Стрельцов С.А., Олейников В.А., Королев С.П., Готтих М.Б., Жузе А.Л. (2007) Биоорганическая химия, 33(6), 613-623.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ МАСТЕР РЕГУЛЯТОРОВ РАЗВИТИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ОПУХОЛЕВЫХ ОБРАЗЦАХ

Кондратьева Л.Г., Чернов И.П., Копанцев Е.П., Зиновьева М.В.

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

Электронный адрес: Liakondratyeva@yandex.ru

Рак поджелудочной железы (ПЖ) является одним из наиболее трудно поддающихся лечению видов опухолевых заболеваний. Исследование молекулярно-биологических процессов, происходящих при развитии рака ПЖ является крайне актуальной задачей, решение которой предоставит новые возможности для терапии этого заболевания.

Данное исследование посвящено изучению изменения экспрессии в опухолевых тканях семи мастер регуляторных генов развития ПЖ: *SOX9*, *GATA4*, *PDX1*, *PTF1a*, *HNF1b*, *KLF5* и *ZEB1*. Относительное содержание транскриптов мастер генов определяли методом ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. В качестве матрицы использовали кДНК приготовленную из хирургических образцов, полученных в Институте хирургии имени А.В. Вишневского. Хирургические образцы были разделены на три группы: образцы тканей опухоли ПЖ (18), образцы тканей, прилежащих к опухолям (8), образцы нормальной ПЖ (12). Для получения значений относительного содержания транскриптов мастер генов данные нормировали на среднее геометрическое значений референсных генов *18SPHK* и фактора элонгации трансляции *EEF1A*.

Было показано 10-кратное снижение экспрессии в опухолевых образцах по сравнению с экспрессией в нормальной ПЖ генов *GATA4*, *PDX1*, *PTF1a*, *HNF1b*. Для гена *SOX9* на части образцов обнаружено 10-20 кратное снижение экспрессии в опухолях по сравнению с нормой, другие образцы рака ПЖ по экспрессии *SOX9* неотличимы от нормы. Экспрессия гена *ZEB1* в опухолевых образцах снижается в 2-3 раза относительно уровня экспрессии в нормальной поджелудочной железе. Экспрессия гена *KLF5* в опухолевых образцах увеличивается в 2-6 раз по сравнению с нормой. Относительный уровень экспрессии генов *GATA4*, *PDX1*, *PTF1a*, *HNF1b*, *ZEB1* и *SOX9* в образцах тканей, прилежащих к опухоли, практически не отличается от уровня их экспрессии в раковых тканях.

Таким образом, исследование показало, что экспрессия генов большинства выбранных мастер регуляторов значительно понижена в тканях опухолей ПЖ. В тканях, прилежащих к опухоли, которые считаются условно нормальными, уровни экспрессии мастер генов очень близки к образцам рака ПЖ и значительно отличаются от нормальной ткани.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 14-50-00131.

РОЛЬ НОВОГО ТРАНСМЕМБРАННОГО БЕЛКА ХОЛОДНОКРОВНЫХ *c-Answer* В РЕГЕНЕРАЦИИ И РАЗВИТИИ МОЗГА У ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ

Короткова Д.Д.^{1,2}, Иванова А.С.¹, Любецкий В.А.³, Селиверстов А.В.³, Нестеренко А.М.^{1,4}, Терёшина М.Б.¹, Зарайский А.Г.¹

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

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

³Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва

⁴НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва

Электронный адрес: ddkorotkova@gmail.com

Прогрессивное развитие переднего мозга и низкая способность к регенерации крупных придатков тела - важные различия между теплокровными (птицы, млекопитающие) и холоднокровными (рыбы, амфибии, рептилии) животными. Причиной их появления считается перестройка функциональных связей внутри приблизительно одного и того же набора генов. Мы предположили, что возникновение отмеченных различий могло быть также обусловлено исчезновением или появлением отдельных генов. Некоторые из этих генов были идентифицированы с помощью биоинформатического скрининга.

Для проверки гипотезы о том, что такие гены могут одновременно контролировать развитие переднего мозга и регенерацию, мы исследовали экспрессию и физиологические функции исчезнувшего в эволюции гена *c-Answer* в ходе указанных процессов на модельном объекте - шпорцевой лягушке *Xenopus laevis*.

При изучении роли *c-Answer* в развитии переднего мозга методами гибридизации *in situ* и qRT-PCR было установлено, что транскрипты данного гена в эмбрионах локализованы в дорсальной эктодерме, в том числе в зачатке переднего мозга. Показано, что гиперэкспрессия *c-Answer* в зародышах приводит к аномалиям развития головных структур, в частности к увеличению переднего мозга, развитию дополнительного переднего мозга и разрастанию пигментного эпителия сетчатки. При этом в таких эмбрионах наблюдалось расширение зон экспрессии генов-маркеров переднего мозга. В то же время блокирование трансляции мРНК *c-Answer* с помощью морфолиновых антисмысловых олигонуклеотидов (*c-Answer* MO) вызывало уменьшение переднего мозга у головастика.

При исследовании роли *c-Answer* в процессе регенерации было выявлено, что количество мРНК *c-Answer* резко возрастает в раневом эпителии и бластеме регенератов конечностей и хвоста головастика уже на первый день после ампутации. Инъекцированные *c-Answer* головастики демонстрировали восстановление способности к регенерации в период, когда она невозможна. У головастика, инъекцированного *c-Answer* MO, наблюдалось подавление регенерации.

Мы установили, что ген *c-Answer* кодирует трансмембранный белок, мембранная локализация которого была подтверждена с помощью конфокальной микроскопии зародышей шпорцевой лягушки, инъецированных конструкцией EGFP-*c-Answer*.

Полученные данные позволили предположить, что белок *c-Answer* может участвовать в регуляторных сигнальных каскадах, лигандами которых являются факторы роста фибробластов и внеклеточные пуриновые нуклеотиды. С помощью ко-иммунопреципитации было проведено тестирование взаимодействия *c-Answer* с рядом лигандов и рецепторов этих сигнальных каскадов, и выявлено связывание *c-Answer* с двумя трансмембранными рецепторами - FGFR4 и P2Y1.

Результаты настоящей работы подтверждают предположение о том, что исчезнувший в эволюции ген *c-Answer* регулирует как раннее развитие мозга, так и процесс регенерации придатков тела у шпорцевой лягушки посредством участия в сигнальных каскадах, активных в ходе обоих процессов.

Работа выполнена за счет средств гранта РФФИ № 13-04-40194-НКОМФИ.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ N-КОНЦЕВОЙ ОБЛАСТИ LonA-ПРОТЕАЗЫ *E. COLI* В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ФЕРМЕНТА

Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: kudzhaev_arsen@mail.ru

LonA-протеаза *E. coli* (Ec-Lon) - основная АТФ-зависимая протеаза системы контроля качества белков (СКК), которая обеспечивает сохранность клеточного протеома в бактериях и эукариотах. В условиях сопряжения с гидролизом АТФ Ec-Lon деградирует поврежденные и аномальные белки по процессивному механизму (без высвобождения высокомолекулярных промежуточных продуктов). Фермент также участвует в регуляции многих биологических процессов путем деградации специфических регуляторных белков.

Субъединица Ec-Lon объединяет N-концевую некаталитическую область, образованную N-концевым (N) и α -спирализованным (HI(CC)) доменами, АТФ-азный модуль, включающий нуклеотидсвязывающий (NB) и α -спирализованный (H) домены, и протеолитический (P) домен, представленный серин-лизиновой пептидгидролазой.

Двухдоменная организация N-концевой области Ec-Lon и всего пула LonA является характеристикой, уникальной для протеаз СКК, вместе с тем роль этой области в функционировании ферментов до настоящего времени остается малоизученной. Предполагается, что мутации и делеции в N-концевой области могут влиять на ферментативные свойства LonA-протеаз. Кроме того, есть указания на то, что эта область участвует в связывании белкового субстрата, а также важна для олигомеризации LonA-протеаз.

С целью прояснения роли N-концевой области в функционировании Ec-Lon был получен ряд делеционных форм фермента (Lon-d106, Lon-dHI(CC), Lon-d172, Lon-d234) и охарактеризованы их энзиматические свойства в сравнении со свойствами интактной Ec-Lon-протеазы.

Установлено, что N-концевая область Ec-Lon-протеазы имеет исключительное значение для формирования АТФ-азного и пептидазного центров фермента и реализации их взаимовлияния, необходима для корректного связывания и гидролиза белкового субстрата, а также для стабилизации структуры фермента.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 14-50-00131).

ЛИГАНДЫ ЦИС-ПЕТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИЗ ЯДА СЕРОЙ ЖАБЫ *BUFO BUFO*

Лебедев Д.С., Иванов И.А., Крюкова Е.В., Старков В.Г., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
Электронный адрес: dmitry-1@bk.ru

Кожный секрет паротидных желёз (яд) амфибий рода *Bufo* содержит значительное количество биологически активных соединений. Тысячелетиями он использовался в качестве яда, лекарства и наркотика. Так в традиционной китайской медицине широкое применение имеет высушенный яд *Bufo bufo*, известный как Чан-Су. К соединениям, выделенным из этого секрета, можно отнести буфодиенолиды, содержащие в своей структуре лактонное кольцо и являющиеся мощными сердечными гликозидами, а так же буфотенины, имеющие серотонино-подобную структуру и воздействующие на серотониновый рецептор 5-HT₃ типа.

В ходе исследования нами было показано агонистическое действие яда *Bufo bufo* на рецептор γ -аминомасляной кислоты типа А состава $\alpha 1\beta 3$. Активные вещества были выделены методом гель-фильтрации с последующей обращённо-фазовой хроматографией. Методами масс-спектропии и ЯМР было установлено, что этими веществами являются дипептиды аргинина и дикарбоновых кислот: N-субериларгинин, N-пимелоиларгинин и N-адипиларгинин.

Также была продемонстрирована способность натурального яда *Bufo bufo* конкурировать с 125 -меченым бунгаротоксином за связь с никотиновым ацетилхолиновым рецептором (nAChR) мышечного и $\alpha 7$ типов. Хроматографическое разделение яда и масс-спектрометрический анализ фракций установили, что действующими веществами являются буфотенин и буфотенидин. Методами электрофизиологии и кальциевого имиджинга было показано, что буфотенин действует на nAChR $\alpha 7$ типа в качестве агониста, и проявляет антагонистическое действие в отношении nAChR мышечного типа.

МАЛАЯ НЕКОДИРУЮЩАЯ РНК MTS1338 В АДАПТАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ К МАКРОФАГАЛЬНОМУ СТРЕССУ

Мазурова А.С.¹, Григоров А.С.², Суслина А.В.², Салина Е.Г.³, Капрельянец А.С.³, Ажикина Т.Л.¹

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

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

³Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

Электронный адрес: mazarina@yandex.ru

Туберкулёзные микобактерии способны персистировать в организме хозяина долгое время, переходя в латентные формы. В настоящий момент идет поиск генетических механизмов такого перехода. Существенную роль в регуляции экспрессии генов прокариот играет некодирующий транскриптом (нетранслируемые области мРНК, малые РНК и др.).

Мы исследовали роль малой некодирующей РНК MTS1338 в метаболизме *M. tuberculosis*. MTS1338 высококонсервативна в геномах микобактерий туберкулезного комплекса, что может указывать на ее роль в регуляции развития инфекции. Экспрессия MTS1338 значительно повышается при переходе в стационарную фазу роста, состояние покоя, а также в условиях инфекции спустя 6-7 недель после заражения, т.е. при начале активного иммунного ответа.

Для выяснения биохимических путей, регулируемых MTS1338, был создан штамм *M. tuberculosis* с увеличенной экспрессией MTS1338. Анализ транскриптома методом RNA-seq выявил группы генов, экспрессия которых статистически достоверно изменяется при увеличении количества транскриптов MTS1338. Среди них большой интерес представляют гены, принимающие участие в ответе на воздействие NO, важнейшего фактора поражения микобактерий в макрофагальной фагосоме. Кроме того, нами был получен штамм, несущий конструкцию для оверэкспрессии антисмыслового транскрипта asMTS1338. Изменения экспрессии при существенном снижении количества транскриптов MTS1338 коррелируют с изменениями при делеции гена rhoP. PhoPR - сигнальная система, регулирующая ряд генов, включая гены, участвующие в метаболизме клеточной стенки. Кроме того, при сравнении транскриптомов штаммов с увеличенным и уменьшенным числом транскриптов MTS1338 нами было обнаружено значимое увеличение уровня экспрессии гена Rv0081 - важнейшего регулятора, участвующего в ответе на гипоксический стресс. Таким образом, MTS1338 может быть ключевым звеном, связывающим DosRS и PhoPR и Rv0081.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-04563-а и Программой Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология".

ВЛИЯНИЕ SYBR Green I НА ОБРАЗОВАНИЕ НЕСПЕЦИФИЧНЫХ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ "КАТЯЩИМСЯ КОЛЬЦОМ" С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗЫ Bst Eho⁺

Максимова М.А., Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р.

Институт биохимии и генетики Уфимского НЦ РАН, Уфа
Электронный адрес: maxmag99@mail.ru

Изотермическая амплификация позволяет быстро наработать целевые фрагменты ДНК при постоянной температуре, при этом расхождение цепей нуклеиновых кислот обеспечивается использованием ДНК полимераз с цепь-смещающей активностью [1, 2]. Наиболее часто для этой цели применяется большой фрагмент ДНК полимеразы из *Bacillus stearothermophilus* - Bst eho⁺. Однако для нее нередко наблюдается образование неспецифических продуктов амплификации, и механизм данного явления до сих пор неизвестен.

Нами изучено влияние ряда параметров на образование неспецифических продуктов при протекании амплификации "катящимся кольцом" (RCA). Данная реакция в варианте проведения с двумя праймерами (раификация) представляет, на наш взгляд, удобную модельную систему для изучения работы ДНК полимеразы Bst eho⁺, поскольку позволяет путем простого гель-электрофоретического анализа оценивать результат амплификации по наличию характерной для раификации лестницы полос (конкатемерные продукты). Были синтезированы небольшие (50 нт) одноцепочечные ДНК, и получены кольцевые матрицы на их основе путем внутримолекулярного лигирования. Для некоторых праймерных систем, подобранных к кольцевым ДНК матрицам, наблюдалось образование конкатемерных продуктов в отсутствие кольцевой матрицы, на линейной матрице или даже в отсутствие ДНК мишени. Однако при проведении RCA в режиме реального времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I наработка неспецифических продуктов не наблюдалась, и реакция протекала строго специфично, т.е. только с кольцевой матрицей. Добавление ДМСО (до 5% об.) не снимало ингибирующего действия SYBR Green I. Для понимания механизма неспецифической амплификации ДНК с помощью полимеразы Bst eho⁺ требуются дальнейшие исследования.

Литература

1. Fakruddin M, Mannan KS, Chowdhury A, Mazumdar RM, Hossain MN, Islam S, Chowdhury MA. Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. J Pharm Bioallied Sci. 2013; 5(4):245-52.
2. Kimura Y, de Hoon MJ, Aoki S, Ishizu Y, Kawai Y, Kogo Y, Daub CO, Lezhava A, Arner E, Hayashizaki Y. Optimization of turn-back primers in isothermal amplification. Nucleic Acids Res. 2011; 39(9):e59.

ГИСПИДИН-3-ГИДРОКСИЛАЗА: ФЕРМЕНТ БИОСИНТЕЗА ЛЮЦИФЕРИНА ВЫСШИХ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ГРИБОВ

Маркина Н.М., Котлобай А.А., Мокрушина Ю.А., Саркисян К.С., Ямпольский И.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: markina.nadya@gmail.com

Свечение живых объектов всегда привлекало людей вообще и учёных в частности. В лабораторной практике широко применяются методы на основе флуоресценции, фосфоресценции и хемилюминесценции (в частности, биолюминесценции). Однако несмотря на более чем полувековую историю открытия и широкое использование биолюминесцентных систем на основе разнообразных люциферинов и люцифераз (например, светлячка *Photinus pyralis*, кишечнорастворимого *Renilla reniformis* и др.) в настоящее время непропорционально мало известно про биосинтез различных люциферинов.

Недавно была расшифрована структура люциферина биолюминесцентных высших грибов (Purto et al., 2015). Данное соединение получило название 3-гидроксигиспидина и является гидроксильированным производным гиспидина ((E)-6-(3,4-дигидроксистирил)-4-гидрокси-2H-пиран-2-она).

В биолюминесцентном грибе *Neonothopanus nambi* нами был обнаружен и описан фермент, катализирующий реакцию гидроксильирования гиспидина по положению 3 пиранонового кольца. Мы назвали данный фермент гиспидин-3-гидроксилаза (hispidin-3-hydroxylase, H3H). Биоинформатический анализ предсказывает наличие близких гомологов этого фермента в других высших биолюминесцентных грибах (например, *Panellus stipticus*, *Mycena cytricolor*, *Armillaria mellea* и др.).

Функциональность данного белка была доказана в гетерологической системе экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris*, также были созданы конструкции ДНК, кодирующие данный фермент, для экспрессии в бактериях и культурах клеток млекопитающих.

Мы предполагаем, что открытие данного фермента является важным шагом к созданию полностью автономной гетерологической системы биолюминесценции, в которой будут происходить как биосинтез люциферина, так и его взаимодействие с люциферазой.

СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ЛАНТИБИОТИКОМ НИЗИН И ЛИПИДОМ-II В БИОМЕМБРАНЕ

Панина И.С., Чугунов А.О., Нольде Д.Е., Ефремов Р.Г.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: irinaspanina@gmail.com

На сегодняшний день, когда патогенные микроорганизмы развивают резистентность к существующим антибиотикам быстрее, чем ученые успевают разрабатывать новые, возрастает интерес к антимикробным веществам, выделяемым самими бактериями для борьбы с представителями других штаммов - бактериоцинам. Одним из наиболее изученных бактериоцинов является низин - посттрансляционно модифицированный антимикробный пептид, принадлежащий к классу лантибиотиков. Низин взаимодействует с пирофосфатной группой молекулы-предшественника бактериальной клеточной стенки - липида-II, изменение химической структуры которой представляется существенно менее вероятным, чем замена одной аминокислоты на другую в составе белка.

Известна пространственная структура комплекса низин/липид-II в диметилсульфоксиде (ДМСО), однако на поверхности бислоя комплекс может формироваться иначе. Нашей задачей является изучение методом молекулярной динамики (МД) молекулярных механизмов распознавания низином его мишени, а также предсказание структуры их комплекса в бактериальной мембране. Моделируемый липидный бислой представляет собой смесь пальмитоил-олеил-фосфатидил-глицерина (ПОФГ) с пальмитоил-олеил-фосфатидил-этанололамином (ПОФЭ) в соотношении 3:1, что соответствует составу мембран грамположительных бактерий.

Наши эксперименты показали, что пирофосфатная группа изолированной молекулы липида-II в мембране может принимать такие же конформации, как в комплексе. В этих состояниях липид-II формирует уникальное расположение акцепторов водородной связи на поверхности, нехарактерное для других частей мембраны. Мы предполагаем, что эта конформация может подходить для захвата "ловушкой" (низином). Кроме того, было показано, что липид-II вызывает стабильные изменения топографических и гидрофобных свойств поверхности мембраны, которые могут играть важную роль в межмолекулярном распознавании.

Состояния молекулы низина в водном растворе, напротив, не соответствуют найденным в комплексе, тем не менее, ее высокая подвижность позволяет предположить, что захват мишени индуцирует существенные структурные изменения.

Путем совмещения полученных структур комплекса с выбранными конформациями липида-II в мембране были получены потенциально возможные, стерически не затрудненные модели комплекса, динамические свойства которых должны быть изучены.

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ НА УСТОЙЧИВОСТЬ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛИПОСОМ, НЕСУЩИХ В БИСЛОЕ ЛИПОФИЛЬНОЕ ПРОЛЕКАРСТВО МЕЛФАЛАНА

Третьякова Д.С., Водовозова Е.Л.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: elvod@lipids.ibch.ru

Для уменьшения связывания с белками в кровотоке и повышения стабильности наночастиц их поверхность покрывают высокогидратируемыми соединениями. В данной работе исследована стабильность в сыворотке крови 100-нм-липосом из яичного фосфатидилхолина, несущих в бислое диолеилглицеридный конъюгат противоопухолевого препарата мелфалана, в зависимости от структуры включенных в мембрану защитных молекул. Использовали два вида липосом: с раствором кальцеина в самозатухающей концентрации (80 мМ) во внутреннем водном объеме и с донорно-акцепторной парой флуоресцентных зондов в липидном бислое (FRET, резонансный перенос энергии). В качестве защитных молекул в бислое включали фосфатидилинозит (PI, 10%), ганглиозид GM1 (2% и 10%), ПЭГ2000-фосфатидилэтанололамин (2% и 10%) и конъюгат фосфолипид с СООН-модифицированным олигопептидом (2% и 10%). Определяли кинетику вытекания кальцеина или возрастание сигнала донора флуоресценции в ходе 24-ч инкубации липосом в 80% сыворотке крови человека. Липосомы с PI показали высокую стабильность (вытекание кальцеина <5% от максимального) в первые 5 ч инкубации, а липосомы с 2% GM1 - в течение всего времени инкубации. При повышении содержания GM1 до 10 % наблюдался первоначальный выброс кальцеина с выходом на плато. Очевидно, электростатические взаимодействия отрицательно заряженных белков с жесткой (отрицательно заряженной) олигосахаридной оболочкой на мембране приводят к перегруппировке в жидком бислое путем латеральной диффузии и образованию пор, через которые высвобождается кальцеин. Еще сильнее этот эффект проявился для липосом с 10% липопептида, отрицательно заряженные структуры которого в то же время в наибольшей степени (среди всех исследованных защитных конъюгатов) снижали сорбцию белков по данным FRET. Однако введение лишь 2% липопептида не изменило значительно характер взаимодействий поверхности бислоя с белками. Наиболее нестабильное поведение в буфере и сыворотке крови проявилось для образцов с ПЭГ-липидом: наблюдались последовательные всплески и затухания флуоресценции кальцеина, которые могут свидетельствовать об образовании ПЭГ-мицелл с компонентами бислоя. Таким образом, включение ПЭГ-липидов не увеличивало стабильность жидкого липидного бислоя.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-01585.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ТРАНС-СПЛАЙСИНГА У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Уткина М.В., Максименко О.Г., Георгиев П.Г., Тихонов М.В.

Институт биологии гена РАН, Москва

Электронный адрес: <http://www.genebiology.ru>

Существуют разнообразные механизмы процессинга РНК в клетках. Как оказалось, созревание мРНК играет важную роль и в регуляции экспрессии генов. Одним из примеров посттранскрипционных модификаций РНК, имеющих большое значение в регуляции экспрессии генов эукариот, является транс-сплайсинг. Сущность его заключается в том, что происходит объединение экзонов, принадлежащих к разным молекулам РНК. В настоящее время транс-сплайсинг обнаружен у простейших (трипаносом, эвглен), круглых и плоских червей, а также в митохондриях, хлоропластах и безрибосомных пластидах высших растений. У *Drosophila melanogaster* было обнаружено около 80 генов, в которых с высокой долей вероятности происходит транс-сплайсинг. Наиболее хорошо транс-сплайсинг описан для локуса *mod(mdg4)*, который кодирует 31 изоформу, отличающихся по С-концевому домену. В локусе *mod(mdg4)* транс-сплайсинг происходит между 5' транскриптом, который содержит четыре общих для всех изоформ экзонов, и одним из альтернативных экзонов, транскрибируемых с независимых промоторов, в том числе и находящихся в противоположной ориентации относительно основного транскрипта. Структура локуса *mod(mdg4)* остается консервативной для всех исследованных насекомых, включая тутового шелкопряда и москитов.

В ходе наших исследований было выяснено, что для осуществления транс-сплайсинга необходим интрон, расположенный после последнего базового экзона. Последовательность интрона была проанализирована и были обнаружены вторичные структуры, сигнал полиаденилирования и модификации N3K4Me3, которая характерна для промоторной области.

Для детального изучения интрона, мы условно разделили на несколько участков. Для поиска элементов, необходимых для транс-сплайсинга были созданы генетические конструкции, получены трансгенные линии дрозофилы с различными вариантами делеций интрона. Затем измерялся уровень транскрипции при делеции разных участков интрона *in vivo*. Было обнаружено, что в интроне происходит терминация транскрипции, что выбивается из общего правила супрессии терминации транскрипции в интронах. Был обнаружен участок, отвечающий за данный процесс. В интроне был также картирован регуляторный элемент, который необходим для осуществления транс-сплайсинга. Предварительные результаты показывают, что транс-сплайсинг в локусе *mod(mdg4)* происходит по новому ранее не описанному механизму.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-24-00166.

ВЛИЯНИЕ БЕТА-АЛАНИНА И АТФ НА ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ К АЛЛЕРГЕНАМ В НИЗКОДОЗОВОЙ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

Чудаков Д.Б., Свирицевская Е.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: boris-chudakov@yandex.ru

В настоящее время тема изучения механизмов патогенеза формирования IgE - опосредованного аллергического иммунного ответа привлекает внимание многих исследовательских групп. В последние годы прежнюю концепцию ведущей роли звеньев адаптивного иммунного ответа (Т-хелперы) в этом процессе сменяет новая, постулирующая ведущую роль звеньев врожденного иммунного ответа, в которой ведущую роль играют лимфоидные клетки врожденного иммунитета 2-го типа, продуцирующие ключевые для аллергии цитокины ИЛ-4 и ИЛ-13 в ответ на алармины, высвобождающиеся эпителиальными клетками в месте входа аллергенов.

Целью данной работы была проверка влияния аларминов на гуморальный ответ в разработанной нами прежде низкодозовой аллергической модели.

Мышей линии BALB/c иммунизировали подкожно в область холки 2-3 раза в неделю смесью рекомбинантных белков Asp f2, Asp f3, Der f2 в низкой дозе (100нг) без стимулов, с добавлением в аликвоты бета-аланина до концентрации 0,3М, или с добавлением смеси α , β -метилена-АТФ+АТФ до концентраций 0,1мМ и 0,4мМ соответственно. Продукцию аллерген-специфических антител оценивали методом ИФА в сыворотках, взятых на 20-й (после 7 иммунизаций) и 41-й (13 иммунизаций) дни.

Введение бета-аланина, но не АТФ, оказывало слабый стимулирующий эффект на продукцию Asp f2 специфического IgE на ранний (20-й день) срок ($p=0,070$), но разницы на поздний (41 день) срок не наблюдали ($p=0,485$). В отношении Asp f3 и Der f2 стимуляции не наблюдалось в обеих временных точках. Смесью АТФ и его негидролизуемого аналога также не оказывала эффекта. Были отмечены слабые стимулирующие эффекты бета-аланина, но не АТФ, на продукцию Asp f2 и Asp f3, но не Der f2, специфического IgG1, на ранний срок (соответствующие значения p составляют 0,079; 0,044; 0,239). Стимуляцию продукцию IgG2a не наблюдали.

Настоящими данными невозможно подтвердить однозначную роль использованных аларминов как триггеров продукции специфического IgE, что может объясняться существованием в нашей модели иных механизмов, приводящих к формированию IgE - специфических В-клеток.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ПОВЕРХНОСТНОЙ МОДИФИКАЦИИ НАНОСТРУКТУР С ЦЕЛЬЮ ИХ ЭФФЕКТИВНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

Шипунова В.О.¹, Зелепукин И.В.¹, Никитин П.И.², Никитин М.П.^{1,2},
Звягин А.В.^{1,3}, Деев С.М.¹

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

²Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва

³Московский физико-технический институт, Москва

Электронный адрес: viktoriya.shipunova@phystech.edu

Задачей работы являлась разработка универсальных путей простой модификации нано- и микрочастиц биомолекулами с сохранением ориентированности и активности присоединяемых молекул, например, на основе специфичных взаимодействий пептидов, связывающих твёрдую фазу. Известно, что существуют пептиды, которые способны селективно связывать широкий ряд неорганических материалов и опосредовать поверхностную модификацию наночастиц биомолекулами без нарушения их функций. Более того, поскольку пептиды могут быть генно-инженерно слиты с другими белками, это открывает широкие возможности для прямой модификации наночастиц без вовлечения дополнительных шагов, например, химической конъюгации. В частности, в работе была использована высокоаффинная белковая молекулярная пара - барназа*барстар (Deyev et al.//Nat. Biotechnol. 2003) как модульный блок (или "молекулярный конструктор") для универсальной модификации наночастиц требуемыми компонентами с применением пептидной технологии. Получение белков слияния одного из компонентов данной пары (например, барстара) с пептидами, связывающими поверхность наночастиц как твёрдую фазу, и использование белков слияния другого компонента (например, барназы) с распознающими или флуоресцентными блоками позволило получить универсальные наноконструкции с заданными характеристиками. Эффективность данного подхода была продемонстрирована как в бесклеточных *in vitro* системах, так и на примере эффективной адресной доставки полученных мультифункциональных комплексов к раковым клеткам с использованием метода МРQ-цитометрии. Таким образом, в данной работе были разработаны новые надёжные инструменты для биофункционализации наночастиц для биомедицинских применений.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ и Фонда поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых "Национальное интеллектуальное развитие" в рамках научного проекта № 17-34-80105 "мол_эв_а".

ТЕЗИСЫ СТЕНДОВЫХ СООБЩЕНИЙ

СЕКЦИЯ 1

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ. БИОКАТАЛИЗ

1.1 ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СОХРАНЕНИЕ АКТИВНОСТИ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ МЕТАНМОНООКСИГЕНАЗЫ ИЗ *METHYLOCOCCUS CAPSULATUS* (M)

Авдеева Л.В., Гвоздев Р.И.

Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка

Электронный адрес: tuman@cat.icp.ac.ru

Мембраносвязанная метанмонооксигеназа является ключевым ферментом метанотрофных бактерий, которые окисляют метан до метанола и представляет собой мультибелковый комплекс: мембраносвязанная метангидроксилаза (мМГ), NADH-оксидоредуктаза и ряд переносчиков электронов (возможно цитохромы и др.). В настоящее время в лаборатории Э.С. Розенцвейг выделены и закристиализованы мМГ из 4 метанотрофов: *Methylococcus capsulatus* (Bath), *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Methylocystis species* Strain M и *Methylocystis species* strain Rockwell. У всех изученных микроорганизмов мМГ является трехпептидным ферментом $\alpha\beta\gamma$, первичные последовательности которых очень близки между собой. Самая крупная субъединица фермента (α) расположена в гидрофильной области над поверхностью мембраны, две другие утоплены в липидный бислой мембраны. По данным РСА в гидрофильной α -субъединице фермента из *M. capsulatus* (Bath), *M. trichosporium* OB3b и *M. species* Strain M найден биядерный медный центр. В мМГ из *M. capsulatus* (Bath) в этой субъединице, кроме того, обнаружен моноядерный медный центр. В структуре мМГ из *Methylocystis sp. str.* Rockwell моноядерный медный центр найден в α - и в γ -субъединице. Однако препараты мМГ, используемые для кристаллизации, были не активны или обладали очень низкой активностью. С потерей ферментативной активности мМГ в ходе выделения сталкиваются все исследователи. Нами установлено, что железо, также как и медь, необходимо для функционирования мМГ, оно входит в состав мМГ и теряется при выделении и очистке фермента. При введении в буферные среды для выделения одновременно 50 мкМ Cu(II) и Fe(III) нам удалось получить солюбилизованную мМГ с активностью на 30-35% выше по сравнению с контролем. Замена обессоливания солюбилизованной мМГ методом гель-фильтрации на центрифугирование на ячейках Centricon 50000 (Millipore) позволила получить препараты мМГ с активностью на 20-25% выше по сравнению с контролем. При хранении препаратов мМГ в холодильнике (при -20°C или -86°C) наблюдается потеря активности фермента с течением времени (на 73 и 36%, соответственно). Установлено, что наименьшая потеря активности мМГ происходит при хранении в жидком азоте.

Таким образом, для сохранения активности мМГ необходимо количество стадий очистки фермента снизить до минимума, дополнить буферные среды выделения солями меди и железа и отказаться при хранении препаратов мМГ от холодильников.

1.2 ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ СИЛИКАГЕЛЕВОЙ ПОДЛОЖКИ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ РЕДЬКИ ЧЕРНОЙ

Аралкин О.Л., Биба М.В., Вяткина О.В.

Таврическая Академия (структурное подразделение) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского", Симферополь
Электронный адрес: kd-1994@mail.ru

Пероксидаза - фермент, относящийся к гемсодержащим гликопротеидам. Высокая чувствительность нативного фермента к температуре, pH среды и неустойчивость при хранении ограничивает его практическое использование. Решением данной проблемы является иммобилизация фермента. В качестве подложки перспективен силикагель, структура которого зависит от pH синтеза. Поэтому целью нашей работы являлось исследование влияния структуры силикагелевой подложки на каталитическую активность иммобилизованной пероксидазы корнеплода редьки черной относительно субстрата восстановителя гидрохинона.

Исследования проводили с фосфатно-буферным экстрактом (pH=7) пероксидазы, выделенной из корнеплода редьки черной. по стандартной методике. Силикагель получали из разбавленного дистиллированной водой (1:1) жидкого стекла (силикатный модуль 2.7-3.4), фиксируя pH=10 и pH=2 в системе введением различных количеств раствора 6M HCl; гелеобразование при pH=7 проводили в присутствии 0,2 N NH₄Cl. Иммобилизацию пероксидазы на исследуемые силикагели проводили методом сорбции из фосфатно-буферных растворов при статических условиях при температуре 25°C, из растворов с объёмными концентрациями фермента от 10 до 70%. Концентрацию фермента контролировали фотоколориметрически ($\lambda = 400$ nm).

Активность ферментных препаратов определяли по начальной скорости окисления гидрохинона, остаточные концентрации которого контролировали фотоколориметрическим методом по реакции с о-фенантролином в присутствии ионов Fe³⁺ ($\lambda = 540$ nm). Эффективные кинетические параметры: порядок ($n_{эф}$) и константу скорости реакции ($k_{эф}$) определяли в координатах Вант-Гоффа. Для расчета максимальной скорости ферментативной реакции (w_{max}) и константы Михаэлиса (K_m) использовали координаты Лайнуивера - Берка.

Эксперимент показал, что структура водонерастворимой подложки определяет механизм сорбции фермента и его степень связывания, что обуславливает различие в кинетических параметрах процесса окисления гидрохинона, а, следовательно, и каталитическую активность полученных ферментных препаратов. Иммобилизация пероксидазы на силикагелевой матрице методом физической сорбции повышает каталитическую активность, но снижает избирательность фермента относительно фенольного субстрата по сравнению с его нативной формой.

1.3 СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРЁХПЕТЕЛЬНОГО БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА SLURP-2

Бойко А.А.^{1,2}, Бычков М.Л.^{1,2}, Шуленко М.А.^{1,2}, Долгих Д.А.^{1,2}, Люкманова Е.Н.^{1,2}

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва
Электронный адрес: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) широко распространены в нервной системе и других тканях человека. Нарушение работы nAChR является причиной различных заболеваний. Важные регуляторы ацетилхолиновой передачи - трёхпетельные протоксины семейства Lуб/uPAR. Один из них - SLURP-2 - является секретлируемым трёхпетельным белком человека, впервые обнаруженным в гипер-пролиферирующих кератиноцитах больных псориазом.

Ранее в нашей лаборатории (совместно с Отделом структурной биологии ИБХ РАН) была определена пространственная структура SLURP-2 и продемонстрирована важная биологическая роль этого белка. Было показано, что SLURP-2 регулирует пролиферацию эпителиальных клеток, взаимодействуя с различными подтипами ацетилхолиновых рецепторов. Методами молекулярного моделирования была предложена модель комплекса SLURP-2 с nAChR, однако экспериментально подтвержденных данных о структурных детерминантах, участвующих во взаимодействии SLURP-2 с рецептором, до настоящего времени не было получено.

Чтобы выяснить, какие из элементов структуры SLURP-2 важны для его функциональной активности, мы получили 11 генов, кодирующих мутантные формы SLURP-2 с заменами в первой, второй и третьей петлях нейромодулятора (F9A, R17A, R20A, D21A, R31A, E37A, D38A, K44A, D52A, Y61A, D75A). Были разработаны протоколы биосинтеза и ренатурации из телец включения *E. coli* для каждого из мутантных вариантов SLURP-2, и получены миллиграммовые количества рекомбинантных белков. Корректность аминокислотной последовательности полученных мутантных вариантов была подтверждена методом MALDI-масс-спектрометрии, а влияние мутаций на пространственную структуру анализировали с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии. Было показано, что аминокислотные замены K44A и D75A приводят к нарушению пространственной структуры SLURP-2. Активность мутантных вариантов была исследована на линии кератиноцитов человека Het1-A, что позволило определить структурные элементы, важные для функционирования SLURP-2.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-14-00255.

1.4 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОЗОН-ИНДУЦИРОВАННОГО СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ НА СТРУКТУРУ ФИБРИНСТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО ФАКТОРА МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Васильева А.Д.¹, Бычкова А.В.¹, Юрина Л.В.¹, Бугрова А.Е.¹, Индейкина М.И.¹, Кононихин А.С.^{1,2,3}, Николаев Е.Н.^{1,2,3}, Розенфельд М.А.¹

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

²Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва

³Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

Электронный адрес: ms.kadaver@mail.ru

Плазменный фибринстабилизирующий фактор (рFXIII) является одним из ключевых белков системы свертывания крови, основная функция которого заключается в поддержании гемостаза путем ковалентной стабилизации фибринового сгустка. Подобно многим другим белкам, циркулирующим в плазме крови, рFXIII может подвергаться окислительной модификации под действием активных форм кислорода (АФК), что вызывает нарушение его структуры и функциональных свойств [1].

В работе был использован фибринстабилизирующий фактор, выделенный из человеческой плазмы методом дробного осаждения сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией. Свободнорадикальное окисление белка инициировалось озоном по методике, изложенной в работе [2]. Фибринстабилизирующий фактор подвергался окислению на различных стадиях его активации. При подготовке проб осуществляли последовательный гидролиз образцов ферментами Glu-C и трипсином.

Детектируемость участков молекулы изменяется в зависимости от стадии активации фермента, на которой образец подвергали гидролизу. По данным масс-спектрометрии, окисление приводит к модификациям аминокислотных остатков преимущественно по сайтам цистеина, метионина, триптофана и тирозина. Также получены результаты, согласно которым доля модифицированных аминокислотных остатков в пептидах возрастает при частичной и полной активации фермента перед окислением.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-04-08188 а. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта РФФИ № 14-24-00114.

Литература

1. Komaromi I., Bagoly Z., Muszbek Z. // J. Thromb. Haemost. 2011. V. 9. P. 9-20.
2. Rosenfeld, M.A.; Bychkova, A.V.; Shchegolikhin, A.N.; Leonova, V.B.; Biryukova, M.I.; Kostanova, E.A. // BBA 1834: 2470-2479; 2013.

1.5 ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА УБИКВИТИНА В ТЕРМИНАХ ДИНАМИЧЕСКОГО РАВНОВЕСИЯ, ОПРЕДЕЛЯЮЩЕГО ДЛИНУ ПОЛИУБИКВИТИНОВОЙ ЦЕПИ, И ВРЕМЕНИ ПОЛУЖИЗНИ МОНОМЕРНОЙ ЕДИНИЦЫ

Васькина М.И., Кудряева А.А., Гайнова К.М., Белогузов А.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: marinavaskina04@gmail.com

Протеасома - высокомолекулярный многосубъединичный белковый комплекс, обладающий протеолитической активностью с широкой субстратной специфичностью, является неотъемлемой частью живых клеток от археобактерий до высших эукариот. Основной функцией протеасомы является расщепление отслуживших и дефектных клеточных белков. Сигналом для разрушения белка является так называемая полиубиквитиновая цепь, состоящая из мономеров убиквитина (Ub), ковалентно связанная с субстратом. Относительно недавно был предложен метод сайт-специфического внутриклеточного мечения белков, в основе которого лежит использование лигазы липоевой кислоты *E. coli* (LplA), содержащей ряд замен в активном центре. Данная лигаза путем двухстадийной реакции с участием АТР способна присоединять резорфин к аминогруппе лизина в составе короткого 13-членного пептида. В настоящем исследовании данный подход был использован для изучения внутриклеточного метаболизма поли-Ub конъюгатов. В результате впервые были определены особенности метаболизма главного медиатора системы убиквитицирования, молекулы убиквитина, в истинно физиологических условиях. Показано, что среднее время жизни убиквитина составляет порядка 4 часов. Динамическое равновесие достигается при длине поли-Ub цепи в 6 мономерных единиц, в то время как конъюгаты, содержащие более 12 мономеров убиквитина на молекулу белка, существенно теряют свои субстратные свойства в отношении протеасомы и подвергаются активному процессингу деубиквитиназами. Полученные данные свидетельствуют о том, что до четверти молекул убиквитина из состава поли-Ub цепи необратимо утрачивается при каждом акте гидролиза субстрата протеасомой.

Работа была поддержана проектом РФФИ № 14-14-00585 "Молекулярны механизм убиквитин-независимого протеолиза белков протеасомой и его роль в норме и патологии", а также центром коллективного пользования ИБХ РАН (аппаратное обеспечение флуоресцентно-активированного сортирования клеток).

1.6 ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА - ХИМИЧЕСКИЙ СДВИГ В РЯДУ ДИСУЛЬФИД-БОГАТЫХ ПЕПТИДНЫХ ТОКСИНОВ

Власенков Л.А.¹, Чупин В.В.^{1,2}, Дубовский П.В.³

¹Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

²Московский технологический университет (Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва)

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: leo.vlasenkov@gmail.com

Пептидные токсины с молекулярным весом до 10 кДа обладают разнообразной физиологической активностью. Для оптимизации их активности необходимо знание их пространственной структуры. Для этого удобен метод ЯМР. Необходимым этапом определения пространственной структуры пептида методом ЯМР является определение его химических сдвигов. Установлено, что между химическими сдвигами пептида и его пространственной структурой есть взаимно-однозначное соответствие. Существует ряд программ, способных предсказывать химические сдвиги пептидов по их известной пространственной структуре (см. в [1]). Как правило, они используют алгоритмы машинного обучения, тренируемые на базах данных белков с известными пространственными структурами и химическими сдвигами [2]. Однако, до недавнего времени существовало небольшое число пептидных токсинов, для которых, помимо структуры, известны гетероядерные химические сдвиги. Следовательно, и точность предсказания химических сдвигов подобными программами для таких пептидов оказывается ниже, чем для высокомолекулярных глобулярных белков, входящих в упомянутые базы данных. В данной работе мы создали базу данных пространственных структур пептидных токсинов, имеющих, по крайней мере, одну дисульфидную связь и с молекулярным весом не выше 10 кДа, для которых определены гетероядерные химические сдвиги. Мы исследовали точность предсказания химических сдвигов рядом наиболее популярных на сегодняшний день программ, сравнивая рассчитанные и экспериментальные значения для пептидов из нашей базы данных. Наша база данных может быть использована как для тренировки на ней новых алгоритмов машинного обучения с целью повышения точности определения химических сдвигов пептидных токсинов, так и для обучения уже существующих программ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №16-04-01479).

Литература

1. Y. Shen, A. Bax, Protein structural information derived from NMR chemical shift with the neural network program TALOS-N, *Methods Mol Biol*, 1260 (2015) 17-32.
2. B. Han, Y. Liu, S. W. Ginzinger, D.S. Wishart, SHIFTX2: significantly improved protein chemical shift prediction, *Journal of Biomolecular NMR*, 50 (2011) 43-57.

1.7 ПОИСК ПАРТНЕРОВ БЕЛКА EIF1AD

Воробьева Е.Е., Ракитина Т.В., Гарковенко А.В., Смирнова Е.В., Липкин В.М.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: e-elena777@yandex.ru

Ранее в лаборатории белков гормональной регуляции ИБХ РАН был выделен и охарактеризован новый белок EIF1AD. Было установлено, что EIF1AD локализован в ядре и регулирует транскрипцию генов-мишеней, активируемых окислительным стрессом. Важным элементом при исследовании функций новых белков является поиск белков, взаимодействующих с ними. Однако стандартный метод поиска белковых партнеров - иммуноосаждение EIF1AD из клеточных лизатов с использованием антител к нативному EIF1AD или антител к N- или C-концевым тегам - не показал значимых результатов, возможно, вследствие того, что из-за небольшого размера EIF1AD антитела к нему перекрывали участки связывания с другими белками, а попытки присоединить тег на N- или C-конец EIF1AD приводили к потере его функциональной активности. Поэтому для поиска партнеров EIF1AD было решено использовать метод ограниченной перекрестной сшивки формальдегидом. Ранее было показано, что использование для сшивки низких концентраций формальдегида дает сшитые комплексы только находящихся близко друг от друга белков. В результате проведенной работы было показано, что при сшивке 0,5%-м формальдегидом образуются высокомолекулярные комплексы, узнаваемые антителами к EIF1AD. Данные комплексы были выделены иммуноосаждением и проанализированы масс-спектрометрически.

1.8 ВЛИЯНИЕ КРАУДИНГ АГЕНТОВ ДЕКСТРАНА-70К И ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ-8000 НА СТРУКТУРУ АКТИНА И ПРОЦЕССЫ ЕГО ДЕНАТУРАЦИИ

Гагарская Ю.А.^{1,2}, Поварова О.И.¹, Кузнецова И.М.¹, Туроверов К.К.^{1,2}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

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

Электронный адрес: julgag@yandex.ru

Являясь одним из наиболее распространённых белков в природе, актин был найден почти во всех эукариотических клетках. Актин принимает участие во множестве ключевых клеточных процессов, таких как мышечное сокращение, поддержание клеточной формы, деление клеток, транспорт веществ. Большинство имеющихся к настоящему времени представлений о структуре, стабильности и фолдинге актина, а также о процессе его полимеризации сформировались в результате его исследования *in vitro* в разбавленных буферных растворах. Тем не менее, в действительности, белки функционируют внутри клетки, в среде, содержащей большое количество различных биологических макромолекул, в условиях, которые принято называть условиями молекулярного краудинга. Для моделирования таких краудинг сред *in vitro* мы использовали концентрированные растворы инертных полимеров Декстрана-70к и Полиэтиленгликоля-8000 (ПЭГ-8000), обладающих различными гидродинамическими размерами. Размер молекулы ПЭГ-8000 (29.2 Å) сравним с размером молекулы глобулярного актина (55 × 55 × 35 Å), в то время как размер молекулы Декстрана-70к (64.9 Å) близок со значением радиуса инактивированного актина (74 Å) (расчет гидродинамического радиуса инактивированного актина выполнен по формуле: $\log(Rs) = (0.357 \pm 0.005) \times \log(MW) - (0.204 \pm 0.023) [1]$).

В данной работе методом собственной флуоресценции было показано, что Декстран-70к не влияет на структуру глобулярного актина, в то время как увеличение концентрации ПЭГ-8000 приводит к значительному возрастанию параметра *A* и поляризации флуоресценции. Такие изменения параметров собственной флуоресценции могут быть косвенным признаком полимеризации актина, которая происходит даже при низкой ионной силе растворителя. Выбранные краудинг агенты стабилизируют структуру наивного актина, замедляя процесс его денатурации, но не останавливают его.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 14-24-00131).

Литература

1. O.V. Stepanenko, O.I. Povarova, A.I. Sulatskaya, L.A. Ferreira, B.Y. Zaslavsky, I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov, V.N. Uversky, Protein unfolding in crowded milieu: what crowding can do to a protein undergoing unfolding? *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2016 Oct; 34(10): 2155-2170.

1.9 ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕАСОМ-ОПОСРЕДОВАННОГО МЕТАБОЛИЗМА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ С ПРИМЕНЕНИЕМ ДНК-КОДИРУЕМОЙ РЕЗОРУФИН-ЛИГАЗЫ

Гайнова К.М., Васькина М.И., Кудряева А.А., Белозуров А.А.

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

Электронный адрес: kristi_na_96@mail.ru

Модификация белков убиквитином является важным внутриклеточным процессом, который в основном служит сигналом для их деградации 26S протеасомой, таким образом предотвращая накопление неправильно свернутых или отслуживших свою функцию полипептидов. Несмотря на множество методик, разработанных для мониторинга протеасомо-опосредованной деградации белков, большинство из них предполагает добавление веществ, останавливающих белковый синтез, либо подразумевает изоляцию белка-мишени. Данные манипуляции могут в значительной мере искажать значения полужизни белков, в свою очередь приводя к ложной интерпретации результатов. В настоящей работе для мониторинга деградации белков в истинно физиологических условиях нами предложено использование ранее сдизайнированной лигазы липоевой кислоты *E. coli* (LplA) с несколькими заменами в активном центре. Данный фермент специфически лигирует молекулу низкомолекулярного флуорохрома резорифина с последовательностью из 13 аминокислот, слитых с белком-мишенью. Этот метод сочетает в себе преимущества высокоспецифических белковых меток и небольших химических флуорофоров. Полученные нами данные подтвердили работоспособность предложенной методики для изучения деградации полипептидов 26S протеасомой на примере природных субстратов, таких как основной белок миеллина (МВР) и дигидрофолатредуктаза (DHFR). Совмещение внутриклеточного мечения белков резорифином с проточной цитометрией со встроенной функцией сортировки позволило ранжировать индивидуальные белки, а также мини-библиотеки субстратов в терминах их стабильности в клетке. Предложенная методология позволяет проводить наблюдение за разрушением белков в режиме реального времени, не лимитирована ограничениями по продолжительности слежения за деградацией мишеней, достаточно проста в применении и, таким образом, может быть с успехом расширена на другие субстраты, а также их комбинаторные библиотеки.

Работа была поддержана проектом РФФИ № 14-14-00585 "Молекулярный механизм убиквитин-независимого протеолиза белков протеасомой и его роль в норме и патологии", а также центром коллективного пользования ИБХ РАН (аппаратное обеспечение флуоресцентно-активированного сортирования клеток).

1.10 СВОЙСТВА МУТАНТОВ α В-КРИСТАЛЛИНА (HspB5) С ТОЧЕЧНЫМИ ЗАМЕНАМИ В С-КОНЦЕВОМ ДОМЕНЕ, ЭКСПРЕССИЯ КОТОРЫХ КОРРЕЛИРУЕТ С ВРОЖДЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЧЕЛОВЕКА

Герасимович Е.С.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва
Электронный адрес: ewgenia-gerasimowitch@yandex.ru

α В-Кристаллин является малым белком теплового шока и экспрессируется практически во всех тканях, особенно много его в хрусталике глаза и мышечной ткани. α В-Кристаллин участвует в различных внутриклеточных процессах, поэтому его точечные мутации коррелируют с развитием врождённых заболеваний человека. Целью данной работы было исследование свойств мутантов α В-кристаллина с точечными заменами G154S, R157H, ассоциированных с различными формами миопатий, и A171T, экспрессия которого коррелирует с развитием катаракты.

Разработан метод экспрессии и выделения гомогенных препаратов рекомбинантного α В-кристаллина дикого типа и трех его исследуемых мутантов и изучены некоторые их физико-химические свойства. Методами гель-фильтрации и динамического лазерного светорассеяния установлено, что мутанты G154S и A171T формируют олигомеры такого же размера и такой же кажущейся молекулярной массы, как и белок дикого типа. Олигомеры мутанта R157H имеют несколько меньшие размеры. Данные ограниченного протеолиза свидетельствуют о том, что остаток R157H располагается на поверхности олигомеров α В-кристаллина и легко доступен трипсину. Установлено, что мутантные белки G154S и A171T менее термостабильны, чем белок дикого типа и его мутант R157H. Исследовано взаимодействие α В-кристаллина с некоторыми белками-партнёрами. Как мутантные белки, так и белок дикого типа формируют сходные по размеру и составу гетероолигомерные комплексы с 3D-мутантом HspB1. Все изученные формы α В-кристаллина взаимодействуют с HspB6 с образованием гетероолигомерных комплексов с одинаковой молекулярной массой. В дополнение к крупным гетероолигомерам, образуемым всеми кристаллинами с HspB6, точечный мутант R157H кристаллина способен образовывать с HspB6 гетероолигомеры с малой молекулярной массой. При использовании субфрагмента-1 миозина и γ -кристаллина в качестве субстрата мутанты G154S и A171T обладают меньшей шапероноподобной активностью, чем белок дикого типа. α В-Кристаллин с точечной мутацией R157H обладает такой же, как и белок дикого типа, шапероноподобной активностью при использовании субфрагмента-1 миозина, и лучше предотвращает агрегацию γ -кристаллина по сравнению с белком дикого типа. Таким образом, хотя анализируемые мутации не приводят к значительным изменениям структуры, они приводят к изменению взаимодействия с белками-партнерами и шапероноподобной активности α В-кристаллина, следствием чего может быть развитие различных патологий.

1.11 ИЗУЧЕНИЕ АГРЕГАЦИОННЫХ СВОЙСТВ МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ БЕЛКА ЯДЕРНОГО ЭКСПОРТА (NEP) ВИРУСА ГРИППА А

Головки А.О.¹, Королева О.Н.², Друца В.Л.³

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва

³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва
Электронный адрес: nastiagolovko@mail.ru

Белок ядерного экспорта NEP вируса гриппа А является перспективной мишенью при разработке терапевтических подходов к лечению гриппа, поскольку он участвует в целом ряде ключевых процессов, связанных с циклом размножения вируса. В настоящее время структура и свойства белка изучены недостаточно. По данным рентгеноструктурного анализа С-концевой домен (остатки аминокислот 64-121) содержит две антипараллельные альфа-спирали, а N-концевая область не структурирована.

Ранее нами была сконструирована бактериальная экспрессионная система, позволяющая с использованием аффинной хроматографии на Ni-агарозе с высокими выходами получать гомогенные препараты белка NEP с His(6)-модулем на N- или С-конце (NEP-N и NEP-C). Было обнаружено, что белок чрезвычайно склонен к образованию агрегатов. С целью изучения структурных факторов, влияющих на этот процесс, в настоящей работе путем экспрессии в клетках *E.coli* с последующим выделением аффинной хроматографией был получен набор мутантных вариантов белка, содержащих делеции и точечные замены: NEP-Cd1 (Δ 1-15), NEP-Cd2 (Δ 2-39), NEP-Cd3 (Δ 2-61), NEP-Cd (Δ 4-53), NEP-Nd (Δ 4-53), NEP-CGly (Trp78Gly). Методом динамического светорассеяния (DLS) показано, что в растворах природного NEP и всех его изученных мутантных вариантов присутствуют агрегаты размером более 200 нм. Причем наиболее крупные частицы (500-1300 нм) наблюдали в случае NEP-CGly и NEP-Cd3. Изучено влияние внешних факторов (времени выдерживания растворов, температуры, наличия различных добавок) на агрегационные свойства белков. Полученные результаты позволяют заключить: способность NEP к агрегации определяется структурой С-концевой области белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 15-32-20629 и № 13-04-01504).

1.12 ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ АЛЬБУМИНА МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ

Горобец М.Г., Бычкова А.В., Вассерман Л.А., Константинова М.Л., Пронкин П.Г., Розенфельд М.А.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, Москва
Электронный адрес: maria.g.gorobets@gmail.com

Белки, циркулирующие в плазме крови, являются мишенями для активных форм кислорода (АФК). Целью работы является изучение влияния индуцированного озоном свободнорадикального окисления на структуру человеческого сывороточного альбумина (ЧСА).

Известно, что альбумин способен перехватывать около 80% АФК плазмы крови. Данная способность позволяет рассматривать его как белковый антиоксидант и как биологический маркер патологического окислительного стресса [1].

Воздействие озона на альбумин изучено при помощи дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), спектрофотометрии, спектрофлуориметрии, динамического светорассеяния.

При окислении наблюдается уменьшение максимума пика теплопоглощения на кривой плавления альбумина, причиной которого является разрушение молекулярной структуры белка. Показано изменение термограмм альбумина в зависимости от концентрации озона. Продемонстрирован эффект размывания пика белка при хранении окисленного альбумина (около 2 часов), вероятно обусловленный повышенной ассоциацией молекул белка при окислении.

Методом спектрофлуориметрии продемонстрировано тушение флуоресценции триптофана белка и образование битирозинов при индуцированном окислении, показана зависимость интенсивности флуоресценции триптофана и битирозинов от количества озона. С использованием динамического светорассеяния показано увеличение гидродинамических размеров окисленного альбумина, свидетельствующее о формировании межмолекулярных сшивок.

Данные спектрофотометрии свидетельствуют о разрушении феноксильных и имидазольных колец аминокислотных остатков, а также ароматических аминокислотных остатков в составе белка и превращении их в хиноидные производные.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60244 мол_a_дк.

Литература

1. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay / E. Shacter [et al.] // Free Radic. Biol. Med. - 1994. - Vol. 17 - P. 429-437.

1.13 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКЗОГЕННОЙ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ LonA-ПРОТЕАЗЫ ИЗ *E. COLI*

Дубовцева Е.С., Куджаев А.М., Андрианова А.Г.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: zhenyadubovtseva@yandex.ru

LonA-протеаза из *E. coli* (Ec-Lon) - мультифункциональный фермент, который является ключевым участником системы контроля качества (СКК) клеточного протеома, функционирующей в бактериях и эукариотах. Ec-Lon осуществляет сопряженную с гидролизом АТР деградацию аномальных и дефектных клеточных белков по процессивному механизму (без высвобождения высокомолекулярных промежуточных продуктов). Как и другие протеазы СКК Ec-Lon относится к суперсемейству AAA⁺-белков (т.е. АТР-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями).

Субъединица фермента (N—H(CC)—NB—H—P) образована пятью доменами: некаталитическими N-концевым и первым α -спирализованным, включающим участок с coiled-coil конформацией, нуклеотидсвязывающим и вторым α -спирализованным, формирующими АТР-азный модуль, а также C-концевым протеолитическим (серин-лизиновая пептидгидролаза).

Показано, что из всех AAA⁺-протеаз СКК LonA-протеаза является единственным ДНК-связывающим ферментом. В прокариотах LonA-протеаза, связанная с нуклеоидом, осуществляет регуляцию уровня экспрессии внутриклеточных белков. Кроме того, LonA может проявлять как ингибирующее, так и стимулирующее действие на метаболизм ДНК и РНК, а также оказывать влияние на такие клеточные процессы, как упаковка, осуществление репарации и поддержание стабильности ДНК. Вместе с тем, Ec-Lon может дополнительно связывать нуклеиновую кислоту, влияние которой на функционирование фермента все еще остается открытым и требует тщательного исследования.

В связи с этим было изучено влияние экзогенной нуклеиновой кислоты (ЭкзНК) на ферментативные свойства интактной Ec-Lon-протеазы и Ec-Lon, лишенной эндогенной нуклеиновой кислоты вследствие обработки экстракта продуцента неспецифической нуклеазой из *Serratia marcescens* - бензоназой. В качестве модельной ЭкзНК была использована плазмидная ДНК (pET28a). Образование комплекса белок-ЭкзНК детектировали с помощью метода GMSA (*Gel Mobility Shift Assays*). Установлено, что помимо эндогенной нуклеиновой кислоты Ec-Lon-протеаза способна связывать ЭкзНК, что приводит к изменениям в функционировании АТР-азного и пептидазного центров фермента.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 15-04-04627).

1.14 ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ИЗОФОРМ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩИХ БЕЛКОВ ЧЕЧЕВИЦЫ И ГОРОХА

Зазыкина А.Д., Богданов И.В., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: d_n_m@mail.ru

Растительные липид-транспортующие белки (ЛТР) - семейство небольших катионных белков, получивших свое название в связи со способностью обратимо связывать и переносить гидрофобные молекулы в опытах *in vitro*. В геномах растений липид-транспортующие белки представлены семействами генов, кодирующих различные изоформы ЛТР. Экспрессия генов тех или иных изоформ ЛТР определяется прежде всего влиянием на растение окружающей среды, а синтез множественных изоформ ЛТР является одним из элементов защиты от воздействия различных абиотических и биотических стрессовых факторов. Обнаружение нескольких изоформ липид-транспортующего белка в одном растении дает основания для более глубокого изучения биологической роли каждой из них.

Ранее в семенах чечевицы *Lens culinaris* и гороха *Pisum sativum* нами были обнаружены подсемейства из восьми новых липид-транспортующих белков Lc-LTP1-8 и трех новых липид-транспортующих белков Ps-LTP1-3, соответственно. В ходе данной работы методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) была изучена экспрессия генов, обнаруженных изоформ липид-транспортующих белков чечевицы (Lc-LTP2) и гороха (Ps-LTP1-3) в различных органах взрослых растений и на разных стадиях их онтогенетического развития. Из сухих семян и трёхдневных проростков, а также из листьев, стеблей, корней и усиков взрослых растений (35 дней после прорастания) была выделена тотальная РНК и проведена обратная транскрипция с использованием олиго-dT₂₅ праймера. ПЦР-РВ проводили с использованием интеркалирующего красителя EvaGreen (Biotium) и двух зондов, меченных флуоресцентными красителями FAM и ROX, что позволяло проводить постановку нескольких реакций в одной пробирке одновременно. Были выявлены различия в профилях экспрессии генов изоформ липид-транспортующих белков чечевицы (Lc-LTP2) и гороха (Ps-LTP1-3) в исследуемых органах растений и на разных стадиях их онтогенетического развития, в связи с чем высказаны предположения о возможных биологических функциях данных белков.

Исследование выполнено за счет гранта РФФ (проект № 14-50-00131).

1.15 ИССЛЕДОВАНИЕ ТОПОЛОГИИ ЗАРЯД-ОПОСРЕДОВАННОГО МИЕЛИН-ПОДОБНОГО ДЕГРОНА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕГО ГИДРОЛИЗ СУБСТРАТОВ ПРОТЕАСОМНОЙ БЕЗ УЧАСТИЯ УБИКВИТИНА

Зубенко О.Д., Кудряева А.А., Белогуров А.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: oleg.zubenko@mail.ru

Протеасома метаболизирует больше половины внутриклеточных белков, используя полиубиквитиновую цепь в качестве маркера деградации. Тем не менее в природе существуют белки, для протеасомной деградации которых не требуется убиквитинилирование, при этом за связывание с протеасомой отвечает участок белка со специфической аминокислотной последовательностью (дегрон), либо некий вспомогательный белок. Известные на настоящий момент дегроны являются двухкомпонентными и состоят из двух элементов: участка узнавания протеасомой и неструктурированного фрагмента, с которого инициируется разворачивание белка и его транслокация в каталитическую полость протеасомы. В лаборатории биокатализа ИБХ РАН ранее было установлено, что основной белок миелина (МВР) обладает уникальной аминокислотной последовательностью, по которой равномерно распределен протяженный убиквитин-независимый дегрон. На основе МВР была предложена искусственная аминокислотная последовательность, состоящая из 9 повторяющихся фрагментов по 7 аминокислот, которая, как было показано, также является убиквитин-независимым дегроном. Было продемонстрировано, что данный дегрон является однокомпонентным: роль инициаторного неструктурированного фрагмента выполняет участок связывания с протеасомой. В данной работе была исследована зависимость скорости гидролиза модельных субстратов от различных параметров дегрона. Была определена оптимальная длина дегрона, соответствующая 5 повторам элементарной ячейки, установлено, что как N-концевой дегрон, так и C-концевой дегрон способствуют эффективной деградации белка. Также было продемонстрировано влияние интегрального заряда дегрона на скорость гидролиза субстратов, к которым он присоединен. Таким образом, нами был создан и оптимизирован первый искусственный однокомпонентный дегрон, приводящий к убиквитин-независимой протеасомной деградации модельных субстратов. Дальнейшее исследование заряд-опосредованных дегронов может дать более полное представление о механизмах убиквитин-независимой протеасомной деградации белков.

Работа была поддержана проектами РФФИ № 16-34-01045 и РФФ № 14-14-00585.

1.16 УКОРОЧЕННАЯ ФОРМА α -ТУБУЛИНА ОБНАРУЖЕНА В КОМПЛЕКСЕ С ОЧИЩЕННЫМИ ПРОТЕАСОМАМИ

Иванова Е.Ю.^{1,2}, Артамонова Т.О.³, Зайкова Ю.Я.², Ходорковский М.А.³, Цимоха А.С.²

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

³Центр нанобиотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург
Электронный адрес: ivanoval.027@gmail.com

26S Протеасома - мультисубъединичная протеаза, отвечающая за избирательную деградацию белков в клетке. На сегодняшний день есть данные о связи между патогенезом различных заболеваний, включая нейродегенеративные, аутоимунные и онкологические, и нарушениями в работе убиквитин-протеасомной системы. Существует ряд белков с известными и неизвестными функциями, которые постоянно или краткосрочно связываются с 26S протеасомами. Определение белков, взаимодействующих с протеасомами, является одним из важных этапов в понимании функций протеасом в клетке и механизмов их регуляции. Для решения этой задачи на примере клеток миелогенной лейкемии человека использована стратегия аффинной очистки протеасом с последующим масс-спектрометрическим анализом. Протеасомы очищали из стабильной клеточной линии K562, экспрессирующей субъединицу beta7 20S протеасомы, меченную по С-концу НТВН-пептидом. С помощью MALDI-ICR-масс-спектрометрии идентифицированы все субъединицы 26S протеасомы. Показано, что с протеасомами ассоциированы компоненты убиквитин-протеасомной системы, белки теплового шока (HSPA5, 8, 9; HSPA1A; HSPD1 и HSP90AB1) и некоторые белки цитоскелета (актин, α -актинин 4 и α - и β -тубулины). Белки α - и β -тубулины участвуют в формировании микротрубочек. Есть несколько генов α - и β -тубулинов, и они высоко консервативны как между собой, так и между видами. Для многих белков семейства α -тубулинов (48-49 кДа) показано существование различных изоформ - результат альтернативного сплайсинга. Интересно, что вестерн-блот анализ с использованием антител, специфичных к α -тубулину (TUBA4A), выявил присутствие в комплексе с очищенными протеасомами укороченной версии белка с молекулярной массой, соответствующей 40 кДа в системе SDS-электрофореза. Чтобы исключить возможность того, что наблюдаемое взаимодействие протеасом с укороченной формой тубулина является особенностью лишь миелоидных клеток, мы проанализировали протеасомы из клеток почки эмбриона человека линии HEK293. Вестерн-блот-анализ с использованием антител к α -тубулину вновь выявил присутствие укороченной формы α -тубулина в комплексе с аффинно-очищенными протеасомами. Мы предполагаем, что присутствие укороченной формы α -тубулина в списке белков, ассоциированных с протеасомами, может быть результатом процессинга α -тубулина протеасомами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 16-04-10343.

1.17 МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОТОННОГО ТРАНСПОРТА В F_0F_1 -АТФсинтазе С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КВАНТОВО-МЕХАНИЧЕСКОГО ПОДХОДА

Ивонцин Л.А., Машковцева Е.В., Нарциссов Я.Р.

Институт цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва
Электронный адрес: leonid-ivoncin@yandex.ru

F_0F_1 -АТФсинтаза - универсальный белковый комплекс, обеспечивающий синтез АТФ (аденозинтрифосфата) за счет энергии электрохимического градиента ионов водорода. Обладающие высокой степенью консервативности ферменты были обнаружены в бактериях, митохондриях эукариот и хлоропластах. Принцип работы белка у разных организмов одинаков, хотя субъединичное строение несколько отличается. Предполагается, что мембранная часть фермента содержит два полуканала, по которым протоны переносятся через мембрану, однако в настоящее время отсутствует полная информация об их расположении. Ключевой нерешенный вопрос заключается в том, как процесс переноса протонов через мембрану сопряжен с синтезом АТФ.

Первоначально 3D структура заряженных аминокислотных остатков вдоль протонного пути определялась методом ядерного магнитного резонанса. Для описания механизма протонного транспорта через полуканалы необходимо задать потенциал взаимодействия протона и заряженных центров связывания (аминокислоты или молекулы воды), позволяющий определить высоты барьеров и глубины потенциальных ям. Механизм туннелирования протона через потенциальный барьер был рассмотрен без учета поляризации атомов и ориентации электронных орбиталей. В случае связанных состояний в потенциальных ямах проведен расчет спектра энергий по правилу квантования Бора-Зоммерфельда, а заполнение каждого квантового уровня осуществлено согласно распределению Больцмана. Было оценено характерное время транспорта протона между двумя ближайшими центрами связывания. Проведено моделирование методом Монте-Карло возможных путей движения протона через входной полуканал, которое позволило рассчитать среднее время переноса протона (23 пс). Недавние исследования методом электронной криомикроскопии привели к уточнению структуры аминокислотных остатков белковых субъединиц. Однако полученная структура является не полной. Получение остальных атомов может быть выполнено методом имитации отжига, основанным на стохастической оптимизации энергий и длин химических связей между атомами.

Описанный подход может быть использован для описания протонного транспорта в белковых каналах и привести к дальнейшему пониманию механизмов трансформации энергии.

1.18 ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛАТАРЦИНОВ С МЕМБРАНАМИ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Казакова Е.Д.¹, Дубовский П.В.², Волынский П.Е.², Ефремов Р.Г.²

¹Московский технологический университет (Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва)

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

Электронный адрес: edkazakova@gmail.com

Латарцины - цитолитические пептиды из яда паука *Lachesana tarabaevi* [1]. Это линейные (без дисульфидных связей) поликатионные мембраноактивные пептиды, обладающие антибактериальной активностью [2]. Однако есть и побочный эффект - гемолиз эритроцитов. Для уменьшения гемолитической активности латарцинов мы моделируем их взаимодействие методами Молекулярной Динамики (МД) с модельными липидными мембранами, близкими по липидному составу мембранам эритроцитов.

Задача данной работы - подобрать липидный состав мембран эритроцитов, дающий при моделировании для выбранных латарцинов такое же их встраивание, как обнаружено в эксперименте. Кроме того, мы исследовали роль липидного состава мембраны для олигомеризации латарцинов на её поверхности и кооперативности их встраивания в липидный бислой. Для решения данной задачи мы использовали метод молекулярной динамики (МД) в полноатомном и крупно-зернистом приближениях. Мембрану эритроцитов моделировали смесью двух липидов: пальмитоилолеоилфосфатидилхолина (ПОФХ) и пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламина (ПОФЭ), варьируя соотношение ПОФХ/ПОФЭ в диапазоне 5:1/1:1. Показано, что равновесие в системе липид/латарцин достигается при временах моделирования, лежащих в микросекундном диапазоне, следовательно, необходимо использование крупно-зернистого приближения с последующим переводом (при необходимости изучения деталей) в полноатомное представление.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-04-01479).

Литература

1. P.V.Dubovskii, A.A.Vassilevski, S.A.Kozlov, A.V.Feofanov, E.V.Grishin, R.G.Efremov, Latarecins: versatile spider venom peptides, *Cell Mol Life Sci*, 72 (2015)4501-4522.
2. S.A.Kozlov, A.A.Vassilevski, A.V.Feofanov, A.Y.Surovoy, D.V.Karpunin, E.V.Grishin, Latarecins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity, *J Biol Chem.*, 281 (2006) 20983-20992.

1.19 ВЛИЯНИЕ СИГНАЛЬНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ KDEL И REDLK НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ HER2-СПЕЦИФИЧНОГО ТОКСИНА DARPin-LoPE40

Киселева Д.В.^{1,2}, Прошкина Г.М.¹, Рябова А.В.³, Деев С.М.¹

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва

³Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва

Электронный адрес: darkiseleva@mail.ru

Благодаря прогрессу в изучении молекулярных основ канцерогенеза, в последние годы все большую роль в лечении онкологических заболеваний играет таргетная (направленная) терапия. Этот подход основан на использовании адресных бифункциональных агентов, способных избирательно связываться с маркером-мишенью на поверхности опухолевых клеток и вызывать их гибель.

Данная работа посвящена созданию адресного токсина на основе таргетного модуля DARPin и цитотоксического модуля на основе фрагмента псевдомонадного токсина PE40. Адресный модуль DARPin (Designed Ankyrin Repeat Protein) является молекулой неиммуноглобулиновой природы на основе искусственного белка с анкириновыми повторами, способного узнавать онкомаркер HER2 с высокой аффинностью ($K_D=3.8$ нМ) (Steiner D. et al., *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 382. P. 1211-1227). Цитотоксический модуль представляет собой низкоиммуногенный вариант фрагмента псевдомонадного экзотоксина А (LoPE), в котором удалены эпитопы узнавания Т- и В-клеток.

В ходе работы нами получено два варианта токсина DARPin-LoPE: один в С-концевом домене молекулы содержит сигнальную последовательность для ретроградного транспорта REDLK (как в природном токсине), другой - KDEL. Методами конфокальной микроскопии установлено, что обе сигнальные последовательности в составе исследуемых белков обеспечивают транслокацию токсина из аппарата Гольджи в ЭПР. Однако, цитотоксичность DARPin-LoPE-KDEL в отношении HER2-положительных клеток аденокарциномы молочной железы выше в 9 раз, по сравнению с цитотоксичностью DARPin-LoPE-REDLK, что объясняется нами только более эффективным транспортом токсина DARPin-LoPE-KDEL в ЭПР.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-14-00813).

1.20 ИССЛЕДОВАНИЕ Ca^{2+} РЕГУЛЯЦИИ L,D-ПЕПТИДАЗЫ БАКТЕРИОФАГА T5 МЕТОДОМ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА

Коваленко А.О.^{1,2}, Чернышов С.В.¹, Прохоров Д.А.³, Молочков Н.В.³, Микулинская Г.В.¹

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

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

³Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино
Электронный адрес: gertrude-mcfuzz@mail.ru

Один из компонентов системы белков лизиса бактериофага T5 - эндолизин (EndoT5) - цинксодержащая Ca^{2+} -зависимая L,D-пептидаза, чья структура в растворе была недавно установлена методом ядерного магнитного резонанса. Каталитический ион цинка в молекуле фермента координирован с помощью консервативных остатков H66, D73, D130 и H133. Сайт связывания Ca^{2+} и его роль к настоящему моменту не изучены. В данной работе мы впервые исследовали кальциевую регуляцию EndoT5 с помощью сайт-направленного мутагенеза.

Для единичных аланиновых замен были выбраны полярные аминокислотные остатки D113, N115 и D130, входящие в состав подвижной петли EndoT5. Сайт-направленный мутагенез проводили с помощью полимеразной цепной реакции с рекомбинантной плазмидой в качестве матрицы. Полученные конструкции были секвенированы; белковые препараты очищены до состояния электрофоретической гомогенности. Анализ спектров кругового дихроизма не выявил существенных изменений в структуре белка после мутаций. Однако, мутантные белки отличаются от нативного EndoT5 ферментативными свойствами: мутант N115A имеет в 40 раз меньшую удельную активность, мутант D113A - в 2000 раз меньшую. Мутант D130A полностью неактивен, однако способен связывать субстрат. Все мутантные белки проявляют свойственную природному ферменту температурную устойчивость: активные мутанты N115A и D113A сохраняют две трети ферментативной активности после получасового прогрева при 90°C, неактивный мутант D130A после прогрева ренатурирует вторичную структуру. Существенных отличий во влиянии экзогенного Ca^{2+} на мутанты в сравнении с нативным ферментом не выявлено, но для полного ингибирования мутантных белков требуется на порядок большая концентрация металлохелатора. Кроме того, активность нативного белка после ингибирования восстанавливается полностью, а мутантных ферментов - лишь на 20-30%. Мы связываем эти различия с изменениями в динамике подвижной петли после внесенных мутаций.

Аминокислотные остатки D113 и N115 соответствуют канонической консенсусной последовательности N-концевой части EF-петли, входящей в состав домена EF-hand - одного из самых распространенных сайтов связывания Ca^{2+} у живых организмов. Мы предполагаем, что связывание Ca^{2+} эндолизином бактериофага T5 может осуществляться EF-hand подобным способом.

1.21 МЕХАНИЗМ ГИДРОЛИЗА ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА ПРОТЕАСОМОЙ

Кудряева А.А., Белогуров А.А.

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

Электронный адрес: anna.kudriaeva@gmail.com

Основной белок миелина (МВР) - один из главных белковых компонентов миелиновой оболочки аксонов в центральной и периферической нервной системе. Данный белок также является одним из основных аутоантигенов при рассеянном склерозе - системном аутоиммунном демиелинизирующем заболевании центральной нервной системы человека, характеризующемся множественными повреждениями белого вещества. В процессе метаболизма внутриклеточный протеолиз МВР может происходить под действием различных протеаз, а также протеасомы. Абсолютное большинство белков разрушаются протеасомой по убиквитин-зависимому пути. Тем не менее, показано, что принципиально возможна и убиквитин-независимая деградация белков. При этом маркером для деградации обычно служит или аминокислотная последовательность внутри самого белка, или некая вспомогательная молекула. В лаборатории биокатализа ИБХ РАН ранее было установлено, что протеасома способна гидролизовать неубиквитинилированный МВР. В данной работе предложен молекулярный механизм гидролиза МВР протеасомой по убиквитин-независимому пути. На первом этапе было продемонстрировано заряд-опосредованное взаимодействие МВР с протеасомой. Уменьшение высокого положительного заряда МВР приводит к замедлению скорости гидролиза белка. С помощью малых интерферирующих РНК было показано, что 19S регуляторный комплекс не принимает прямого участия в гидролизе МВР несмотря на то, что данный белок может взаимодействовать с отдельными субъединицами 19S, в частности, с убиквитиновым рецептором Rpn10. Удалось установить возможное участие регуляторных частиц PA28 α/β , являющихся интерферон-индуцибельными, и PA28 γ в деградации МВР. Полученные данные свидетельствуют о том, что МВР судя по всему использует отрицательно заряженные дистальные спиральные участки α -субъединиц внешнего гептамерного кольца для взаимодействия, в то время как регуляторные комплексы семейства PA28 обеспечивают попадание полипептидной цепи во внутреннюю протеолитическую камеру.

Работа была поддержана проектами РФФИ № 16-34-01045 и РНФ № 14-14-00585.

1.22 СЕКРЕТИРУЕМАЯ ИЗОФОРМА БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА Lypx1 (SLURP-2) РЕГУЛИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕРЕЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ НЕЙРОНАЛЬНЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Кульбацкий Д.С., Люкманова Е.Н., Шуленко М.А., Шенкарев З.О., Бычков М.Л., Парамонов А.С., Чугунов А.О., Томсен М.С., Долежалъ В., Бертран Д., Кирпичников М.П., Долгих Д.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: d.kulbatskiy@gmail.com

Секретируемый белок семейства Lyp-6/uPAR SLURP-2 является продуктом альтернативного сплайсинга мембранно-связанного нейромодулятора Lypx1. SLURP-2 регулирует рост и дифференциацию эпителиальных клеток. Нами были описаны пространственная структура и фармакологический профиль активности рекомбинантного аналога SLURP-2 с дополнительным N-концевым остатком метионина. С помощью ЯМР-спектроскопии была показана гомология структуры рекомбинантного SLURP-2 с трехпетельными токсинами ядов змей. Аффинная экстракция из мембранной фракции коры головного мозга показала, что SLURP-2 взаимодействует с $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ субъединицами никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAXP). SLURP-2 вызывает умеренное ингибирование вызванных ацетилхолином токов через $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 3\beta 2$ рецепторы, экспрессированные в ооцитах *X. laevis* ($IC_{50} \sim 0.17$ и >3 мкМ, соответственно). SLURP-2 в концентрации <1 мкМ значительно повышает вызванные ацетилхолином токи через $\alpha 7$ nAXP, но вызывает ингибирование тока при больших концентрациях. SLURP-2 действует как аллостерический модулятор на мускариновые ацетилхолиновые рецепторы M1 и M3 типа, усиливая связывание ортостерического антагониста N-метилскополамина. С использованием селективных ингибиторов nAXP и mAXP мы показали, что SLURP-2 стимулирует пролиферацию оральных кератиноцитов, взаимодействуя с $\alpha 3\beta 2$ nAXP и M3 mAXP, а взаимодействие SLURP-2 с $\alpha 7$ -nAXP ингибирует рост клеток. Компьютерное моделирование комплексов SLURP-2 с $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ nAXP подтвердило связывание нейромодулятора с "классическим" ортостерическим сайтом связывания рецептора.

Работа поддержана грантом РНФ (проект № 14-14-00255).

1.23 БАКТЕРИАЛЬНАЯ ПРОДУКЦИЯ И СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАЛОИЗУЧЕННЫХ "ТРЕХ-ПЕТЕЛЬНЫХ" БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА Lypd6 И Lypd6b

Доктюшов Е.В.^{1,2}, Кульбацкий Д.С.^{1,2}, Шуленко М.А.^{1,2}, Царев А.В.^{2,3}, Шенкарев З.О.^{2,3}, Парамонов А.С.^{1,2}, Долгих Д.А.^{1,2}, Люкманова Е.Н.^{1,2}

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

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

³Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

Электронный адрес: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Белки человека Lypd6 и Lypd6b относятся к белкам семейства Lyp6/uPAR. Lyp6/uPAR белки имеют характерную для этого семейства белков "трех-петельную" структуру, которая стабилизирована системой четырех дисульфидных связей. Lypd6 играет важную роль в эмбриогенезе, модулируя активность Wnt/ β -catenin пути. Lypd6b имеет высокую степень гомологии с аминокислотной последовательностью Lypd6 (~60%). Предполагается, что оба белка могут взаимодействовать с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами. В настоящее время биологическая роль Lypd6b неизвестна. Lypd6 и Lypd6b связываются с мембранами с помощью GPI-якоря. Так как в настоящее время получение GPI-связанных Lypd6 и Lypd6b в качестве отдельных белков представляет собой неосуществимую задачу, и проводить функциональные и структурные исследования белков в такой форме крайне трудно, чрезвычайно важно было разработать систему экспрессии для получения миллиграммовых количеств рекомбинантных Lypd6 и Lypd6b в растворимой форме.

Основной целью настоящей работы является разработка эффективных систем экспрессии для Lypd6 и Lypd6b. Эти белки содержат двенадцать цистеиновых остатков, которые образуют шесть дисульфидных связей. Таким образом, получение этих белков в правильной структурной форме - весьма сложная задача. Мы разработали системы продукции Lypd6 и Lypd6b в клетках *E. coli*, сочетая получение белка в виде телец включения с последующим повторным фолдингом *in vitro*. Это позволило нам получить миллиграммовые количества обоих белков Lypd6 и Lypd6b и их ¹⁵N-¹³C-меченые аналоги. Пространственные структуры Lypd6 и Lypd6b были исследованы с помощью ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Создание систем экспрессии для получения рекомбинантных Lypd6 и Lypd6b открывает новые перспективы для дальнейших исследований их роли в функционировании организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 15-04-99517) и РНФ (№ 16-14-00102).

1.24 ПОИСК НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ДИПЕПТИДИЛ-ПЕПТИДАЗЫ-IV - ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-го ТИПА

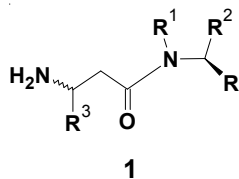
Маслов И.О., Зиневич Т.В.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва
Электронный адрес: i0ann@bk.ru

Выяснение важной роли фермента дипептидилпептидаза-IV (ДПП-IV) в углеводном обмене у больных сахарным диабетом 2-го типа (СД-2) привело в последние годы к разработке нового и очень перспективного в настоящее время метода терапии путём ингибирования этого фермента. Несколько селективных ингибиторов ДПП-IV (например, вилдаглиптин, ситаглиптин, саксаглиптин) уже нашли свое применение в качестве лекарственных препаратов в клинической практике. Однако все они обладают недостатками (например, выраженной нестабильностью структуры) и побочными эффектами, описанными в литературе. Именно поэтому поиску новых ингибиторов для решения описанных выше проблем отводится приоритетная роль.

Целью данного исследования был синтез новых модифицированных ингибиторов ДПП-IV на основе производных амидов β -аминокислот, первичное выявление их эффективности *in vitro* и цитотоксичности.

В результате проведенной работы осуществлен синтез библиотеки новых ингибиторов ДПП-IV - соединений общей формулы 1. Подтверждение структур полученных веществ было выполнено методами ЯМР-спектроскопии и LC/MS.



Влияние полученных соединений на активность рекомбинантной ДПП-IV определяли по изменению скорости расщепления субстрата, рассчитанной на основании данных, полученных спектрофотометрическим методом. Проверку токсического действия соединений-ингибиторов проводили на суточной диплоидной культуре клеток кожи и мышц эмбриона человека путём оценки пролиферативной активности клеток.

На основании полученных результатов была выявлена структура соединения-лидера. Для проведения следующего этапа исследований был разработан метод получения и осуществлен синтез вещества-лидера в граммовых количествах.

1.25 СРАВНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ РЕКОМБИНАНТНОГО КАТЕПСИНА L ИЗ КИШЕЧНИКА ЖУКА-КОЖЕЕДА *DERMESTES MACULATUS*

Пантелеев С.В., Калиберда Е.Н., Бобик Т.В., Руми Л.Д.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: pandelion@mail.ru

В результате исследований пищеварительных ферментов *D. maculatus* в лаборатории химии протеолитических ферментов ИБХ был обнаружен цистеинзависимый протеолитический фермент - катепсин L (cathepsin L, Cat L). Подобный фермент был обнаружен в кишечнике *Tenebrio molitor* (P.T. Cristofaletti, 2005) в виде как внутриклеточного, так и секретируемого фермента, экспрессируемого в виде препрофермента и способного к активации в кислых условиях. Позже был получен рекомбинантный катепсин L *Tenebrio molitor* и установлена его 3D структура (D. Beton, 2012).

В данной работе рекомбинантный катепсин L (rCatL) был получен в формах препрофермента (full-rCatL) и двух зрелых ферментов: N-rCatL и C-rCatL, - с 3FLAG, с-мус эпитопами, 6 гистидинами на C-конце (full-rCatL и C-rCatL), 6 гистидинами на N-конце (N-rCatL) белка. Все три белка были получены на платформе *E. coli* штаммов DE3 и Rosetta. Рекомбинантные белки были очищены методом металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni-agarose. Наличие целевого белка в процессе получения и очистки подтвердили электрофорезом в 10% ПААГ и Вестерн-блоттом. Удельная активность фермента (субстрат Z-A-F-R-pNA, pH 5, 1мМ DTT, 37°C) полученного в разных клетках составила для full-rCatL и C-rCatL: в DE3 не выше 3.72 нмоль/мг×мин, Rosetta - до 22.3 нмоль/мг×мин (после рефолдинга в буфере 50 мМ NaAc, pH 4.5). Экспрессию белка full-rCatL дополнительно провели в клетках Origami, где его активность составила 15.9 нмоль/мг×мин. Белок N-rCatL не проявлял специфической активности с Z-A-F-R-pNA, что говорит о каталитической значимости N-концевой части катепсина L.

Таким образом, перспективными для дальнейшей работы по получению активного рекомбинантного катепсина L являются штаммы Rosetta и Origami.

1.26 ИССЛЕДОВАНИЕ АФФИННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИМИЮЛЛЕРОВА ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА

Рак А.Я., Трофимов А.В., Ищенко А.М.

Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России,
Санкт-Петербург
Электронный адрес: alexandrak.bio@gmail.com

Антимюллеров гормон (АМГ) - гликопротеин суперсемейства TGF- β , участвующий в регуляции развития и функционирования половой системы в эмбриогенезе и постнатальном периоде жизни млекопитающих. С появлением сведений о противоопухолевой активности рекомбинантного АМГ (рАМГ) возникла необходимость исследования его свойств как потенциального лекарственного агента. Полноразмерная форма АМГ имеет молекулярную массу около 140 кДа и является гомодимером. Ограниченный протеолиз молекулы АМГ по специфическому сайту приводит сначала к ее расщеплению по одной цепи, а затем - к разделению на N- и C-концевой гомодимеры (с молекулярной массой около 110 кДа и 25 кДа, соответственно), которые затем образуют нековалентно связанный комплекс. Считается, что эти процессированные формы являются биологически активными производными АМГ, однако остается неясным, какая из них способна с наибольшей интенсивностью взаимодействовать со специфическим рецептором АМГ II типа - MISRII.

Целью настоящей работы стало исследование аффинности связывания с MISRII расщепленного по одной цепи гормона и его C-концевого фрагмента. В работе использованы высокоочищенные препараты расщепленного по одной цепи рАМГ и его C-концевого димера производства ФГУП "Гос. НИИ ОЧБ" ФМБА России. В исследовании был применен метод твердофазного иммуноферментного анализа.

В ходе работы был получен высокоочищенный препарат химерной конструкции, содержащей внеклеточную часть MISRII. Удалось показать, что расщепленный по одной цепи гормон способен связываться с ней с большей аффинностью по сравнению с C-концевым димером рАМГ ($K_{св} = (4 \pm 0,32) \times 10^{10}$ и $(1 \pm 0,08) \times 10^{10}$, соответственно). Кроме того, было выявлено, что процессированный по одной цепи рАМГ конкурирует с C-концевым димером за связывание с рецепторсодержащей конструкцией.

Полученные данные могут свидетельствовать об участии N-концевого фрагмента АМГ в обеспечении максимально аффинного взаимодействия гормона с MISRII, а также о способности нековалентно ассоциированного комплекса N- и C-концевого димеров рАМГ к взаимодействию с MISRII с еще большей аффинностью.

1.27 СТРУКТУРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА, ЛИЗОЦИМА И БЕТА-2-МИКРОГЛОБУЛИНА

Родина Н.П.^{1,2}, Сулацкая А.И.¹, Кузнецова И.М.¹, Туроверов К.К.^{1,2}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

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

Электронный адрес: natalia240994@gmail.com

Многим тяжелым заболеваниями, таким как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, прионные болезни, сахарный диабет второго типа и др., сопутствует образование и накопление в тканях и органах амилоидных фибрилл - упорядоченных белковых агрегатов, богатых бета-складчатыми структурами. Исследования последних лет показали, что, несмотря на сходство общей архитектуры, амилоидные фибриллы, образованные на основе различных амилодогенных белков и даже на основе одного и того же белка, могут иметь существенные различия. Изучение структуры и свойств амилоидных фибрилл является актуальной задачей при поиске агентов для диагностики и терапии амилоидозов, а также для решения фундаментальной проблемы фолдинга белков.

В настоящей работе амилоидные фибриллы на основе альфа-синуклеина, бета-2-микроглобулина и его укороченных форм, а также на основе лизоцима, полученные при различных условиях фибрилlogenеза (pH=2 и pH=7), были охарактеризованы с использованием методов электронной микроскопии, флуоресцентной спектроскопии, а также метода кругового дихроизма. С использованием специального подхода, основанного на подготовке растворов методом равновесного микродиализа, было исследовано взаимодействие с исследуемыми фибриллами специфического флуоресцентного зонда тиюфлавина Т (ThT). Для амилоидных фибрилл на основе лизоцима и альфа-синуклеина показано существование двух мод связывания ThT, в то время как для амилоидных фибрилл бета-2-микроглобулина и его укороченных форм обнаружена только одна мода связывания красителя. Для каждой из обнаруженных мод были определены параметры связывания ThT (константа связывания и количество мест связывания), а также фотофизические характеристики красителя (квантовый выход флуоресценции, коэффициент молярной экстинкции, время жизни флуоресценции), инкорпорированного в амилоидные фибриллы. Полученные результаты позволили сделать заключение о существенных различиях в структуре исследуемых амилоидных фибрилл.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 16-04-01614_a и № 16-54-00230 Бел_a, стипендии Президента РФ СП-1982.2015.4.

1.28 МУТАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ ЦИТОХРОМА *c* ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕРМЕАБИЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМ *c*/КАРДИОЛИПИН

Сазонова А.А.^{1,2}, Черткова Р.В.¹, Долгих Д.А.¹

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

²Московский технологический университет (Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва)
Электронный адрес: rgorpeller22@mail.ru

Цитохром *c* - один из ключевых компонентов митохондриальной дыхательной цепи, он переносит электрон от III к IV комплексу дыхательной цепи, используя редокс-потенциал Fe^{3+}/Fe^{2+} пары. Второй важнейшей функцией цитохрома *c* является инициация формирования апоптосом после его выхода из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму. Кроме того, цитохром *c* эффективно окисляет супероксид-радикал до молекулярного кислорода и является слабым пероксидантом.

Известно, что взаимодействие цитохрома *c* с кардиолипином в разы усиливает его пероксидазную активность, что запускает цепную реакцию перекисного окисления мембранных липидов, приводя в конечном итоге к выходу цитохрома *c* из митохондрии в цитозоль и запуску апоптоза [1]. Ранее было исследовано взаимодействие цитохрома *c* лошади с митохондриальным кардиолипином, что приводило к превращению белка-переносчика электронов в пероксидазу, играющую существенную роль в событиях, приводящих к апоптозу [2]. В настоящей работе были получены восемь мутантных форм цитохрома *c* для последующего исследования роли аминокислотных остатков в проявлении пермеабиллизующей активности комплекса цитохром *c*/кардиолипин. Для введения мутаций в ген цитохрома *c* использовали систему сайт-направленного мутагенеза QuikChange™ Mutagenesis Kit (Stratagene, США). Экспрессию мутантных генов осуществляли в штамме *E.coli* JM109. Выделение и очистку целевых белков проводили при помощи жидкостной хроматографии в два этапа: вначале очистка на катионообменном сорбенте, а затем - на гидроксиапатите. Степень очистки и концентрацию цитохрома *c* в полученных фракциях определяли спектрофотометрически и электрофоретическим анализом в SDS-ПААГ. Далее планируются исследования пермеабиллизующих свойств комплексов мутантный цитохром *c*/кардиолипин.

Литература

1. J.Muenzner, E.V.Pletneva. Chemistry and Physics of Lipids, 2014, V. 179, p.57-63.
2. A.M.Firsov, E.A.Kotova, E.A.Korepanova, A.N.Osipov, Y.N.Antonenko. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1848(3):767-74.

1.29 ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ФОТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ПРЕВРАЩЕНИЯ ХРОМОФОРА В ФОТОКОНВЕРТИРУЕМОМ БЕЛКЕ Dendra2

Санарова Д.Д.^{1,2}, Черткова Р.В.¹, Фролова А.Ю.^{1,2}, Пахомов А.А.¹, Мартынов В.И.¹

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

²Московский технологический университет (Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва)
Электронный адрес: dariasanmarova@gmail.ru

В белке Dendra2 под действием УФ либо голубого света запускается реакция фотоэлиминирования, в результате которой π -система хромофора GFP-типа расширяется за счет имидазолилэтиленильной группы. В ходе химической реакции белок превращается из зеленого в красный. Целью работы являлся анализ каталитической системы, отвечающей за фотоэлиминирование, а также ее оптимизация для увеличения скорости реакции, что было бы полезно для дальнейшего применения белка. В ходе выполнения работы были сконструированы и получены семь мутантных вариантов белка Dendra2, исследовано влияние отдельных аминокислотных остатков на протекание реакции фотоэлиминирования.

1.30 НОВЫЙ МОДУЛЬНЫЙ ТОКСИН *OSKβ1* ИЗ ЯДА СКОРПИОНА *ORTHOCHIRUS SCROBICULOSUS*

Чудецкий И.С.^{1,2}, Кузьменков А.И.^{1,2}, Пеньёр С.³, Титгат Я.³,
Василевский А.А.¹

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

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

³Лёвенский католический университет, Лёвен, Бельгия

Электронный адрес: ivan.chudetskiy@gmail.com

Большинство ядов животных представляют собой многокомпонентные смеси различных соединений. Очень часто основное токсическое действие на организм жертвы оказывают содержащиеся в яде модуляторы ионных каналов. Особый интерес представляют пептидные нейротоксины, которые характеризуются высокой аффинностью и специфичностью в отношении ионных каналов. Подобные свойства обусловили возможность использования нейротоксинов в качестве молекулярных инструментов в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Одним из подходов для поиска новых пептидных нейротоксинов является анализ библиотек кДНК, полученных в результате транскриптомного анализа мРНК из ядовитых желез. С помощью этого подхода нами был идентифицирован потенциальный компонент яда скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*. Интересной особенностью токсина является ярко выраженная модульная структура: молекула состоит из N-концевого линейного участка и C-концевой цистеин-богатой области. Новый двудоменный токсин, названный *OSKβ1*, был получен в бактериальной системе экспрессии. Рекомбинантный *OSKβ1* был использован для исследования биологической активности токсина. Проведено тестирование токсичности в отношении насекомых, антимикробной активности, цитолитической активности на эукариотических клетках. Кроме того, активность токсина была изучена в отношении целого ряда калиевых каналов с помощью методов электрофизиологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 14-14-01180).

1.31 Lynx1 КОНКУРИРУЕТ С $\alpha\beta 1-42$ ЗА СВЯЗЫВАНИЕ С НИКОТИНОВЫМИ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ

Шулепко М.А.^{1,2}, Долгих Д.А.^{1,2}, Хартиг В.⁵, Кирпичников М.П.^{1,2},
Томсен М.^{3,4}, Люкманова Е.Н.^{1,2}

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

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

³Госпиталь Университета Копенгагена, Копенгаген, Дания

⁴Университет Копенгагена, Копенгаген, Дания

⁵Институт исследования мозга им. Пауля Флексига, Университет Лейпцига, Лейпциг, Германия

Электронный адрес: mikhailshulepko@gmail.com

Lynx1 регулирует синаптическую пластичность в мозге, взаимодействуя с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR). Чтобы продемонстрировать способность Lynx1 образовывать комплексы с различными подтипами nAChR в мозге человека и грызунов, мы использовали водорастворимый вариант Lynx1 человека (ws-Lynx1) для аффинной экстракции субъединиц рецептора из гомогената тканей. Было установлено, что Lynx1 связывает $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$, и $\beta 4$ субъединицы nAChR в коре, среднем мозге и обонятельной луковице крысы, а также в коре мозга человека. Инкубация с ws-Lynx1 снижала вызванное никотином фосфорилирование ERK-киназы в клетках PC12, указывая на то, что связывания ws-Lynx1 с рецептором достаточно для ингибирования передачи сигналов, опосредованных nAChR. В этом опыте влияние никотина не зависело от $\alpha 7$ или $\alpha 4\beta 2$ типов рецептора, что позволяет предположить способность Lynx1 действовать на другие подтипы nAChR. Установлено, что β -амилоидный пептид ($\beta 1-42$) ингибирует взаимодействие между ws-Lynx1 и $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ и $\alpha 7$ субъединицами nAChR, соответственно. Кроме того, было показано, что ws-Lynx1 снижает цитотоксичность β -амилоидного пептида на нейроны коры, а экспрессия Lynx1 в коре мозга снижена у трансгенных мышей с бета-амилоидной и tau патологиями. Наши данные свидетельствуют о том, что Lynx1 связывается с несколькими подтипами nAChR в головном мозге, и что это взаимодействие может иметь функциональное и клиническое значение.

Работа выполнена при поддержке РФФ (№ 14-14-00255 и № 16-14-00102).

1.32 РЕКОМБИНАНТНЫЙ МАМБАЛГИН-2 ИЗ ЯДА *DENDROASPIS POLYLEPIS* ЗАМЕДЛЯЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА U251MG

Шулепко М.А.^{1,2}, Бычков М.Л.¹, Андреев Я.А.¹, Осмаков Д.И.¹,
Люкманова Е.Н.^{1,2}

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва
Электронный адрес: mikhailshulepko@gmail.com

Мультиформные глиобластомы являются самыми частыми и наиболее агрессивными опухолями головного мозга. Характерной особенностью клеток глиобластом является наличие амилорид-чувствительного тока, обусловленного активностью протон-чувствительных ионных каналов (ASIC) или их комплексами с эпителиальными натриевыми каналами (ENaC). Данный ток специфичен для первичных глиобластом на поздних стадиях (стадии III и IV) и линий опухолевых клеток, но отсутствует у нативных астроцитов и клеток глиобластом на ранних стадиях. Эти наблюдения делают гетеромерные каналы ASIC или ASIC/ENaC потенциальной терапевтической мишенью. Недавно два пептида, получившие название мамбалгинов, были выделены из яда *D. polylepis*. Мамбалгины относятся к семейству трехпетельных токсинов яда змей и являются селективными ингибиторами рецепторов ASIC.

Вследствие высокого содержания остатков цистеина бактериальная продукция трехпетельных токсинов представляет собой непростую задачу. Нами была разработана эффективная система для бактериальной продукции мамбалгина-2 из яда *D. polylepis*. Полученный рекомбинантный токсин был охарактеризован совокупностью физико-химических методов, включая ВЭЖХ, масс-спектрометрию и ¹H-ЯМР-спектроскопию. Биологическая активность рекомбинантного мамбалгина-2 была протестирована на ооцитах *Xenopus*, экспрессирующих ASIC1a крысы, и оказалась схожей с активностью токсина дикого типа. Инкубация клеток глиобластомы человека U251MG с препаратом рекомбинантного мамбалгина-2 в концентрации 1 мкМ в течение 48 ч приводила к значительному уменьшению количества клеток до ~ 60% относительно контроля. Анализ кривой доза-эффект выявил полуэффективную концентрацию (EC₅₀) для рекомбинантного белка лежащую в наномолярном диапазоне.

Работа выполнена при поддержке президента РФ СП-2663.2015.4

1.33 ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОЗОН-ИНДУЦИРОВАННОГО СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФИБРИНОГЕНА МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Юрина Л.В.¹, Васильева А.Д.¹, Бычкова А.В.¹, Бугрова А.Е.¹,
Индеев М.И.¹, Кононихин А.С.^{1,2,3}, Николаев Е.Н.^{1,2,3},
Розенфельд М.А.¹

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

²Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Гальперина РАН, Москва

³Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный
Электронный адрес: mourimotonari91@gmail.com

Фибриноген - растворимый белок плазмы крови, основной функцией которого является образование нерастворимого фибринового геля под воздействием тромбина. Белки, циркулирующие в крови, являются одними из основных мишеней для активных форм кислорода (АФК). Фибриноген намного более чувствителен к воздействию окислителей, чем другие основные белки плазмы [1]. Было проведено исследование влияния индуцированного озоном свободнорадикального окисления (по методике, изложенной в [2]) на структуру фибриногена методом масс-спектрометрии. В α и β цепях воздействию окислителя были подвержены практически все участки полипептидной цепи. В γ цепи фибриногена наблюдается более низкая степень окисления по сравнению с α и β цепями. При анализе результатов был сделан вывод о том, что в окислительную модификацию не вовлекаются центры самосборки, ответственные за взаимодействия knob 'A': hole 'a', а обнаруженные многочисленные окислительные сайты, главным образом, отвечают за ингибирование латеральной агрегации протофибрилла. Было сделано предположение, согласно которому α С область, наиболее подверженная действию окислителя в α цепи, может выполнять антиоксидантную функцию, экранируя функционально важные части молекулы от воздействия АФК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60244 мол_а_дк. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта РНФ № 14-24-00114.

Литература

1. Shacter E., Williams J.A., Lim M. // Free Radic. Biol. Med. 17:429-436; 1994.
2. Rosenfeld M.A., Shchegolikhin A.N., Bychkova A.V., Leonova V.B., Biryukova M.I., Kostanova E.A. // Free Radic. Biol. Med. 77:106-120; 2014.

СЕКЦИЯ 2

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

2.1 РОЛЬ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ И РЕПАРАЦИИ *D. RADIODURANS* В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ НА ПОВРЕЖДЕННЫХ МАТРИЦАХ

Агапов А.А.^{1,2}, Есюнина Д.М.¹, Кульбачинский А.В.^{1,2}

¹Институт молекулярной генетики РАН, Москва

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва

Электронный адрес: al.a.agapov@gmail.com

Первый этап любого пути репарации ДНК - это распознавание повреждения. Одним из сенсоров повреждений ДНК у бактерий является РНК-полимераза. РНК-полимераза паузирует в участках с нарушенной структурой двойной спирали и инициирует сборку репарационного комплекса. После этого РНК-полимераза удаляется с матрицы. У *Escherichia coli* это может происходить как минимум двумя путями, с участием хеликаз UvrD и Mfd. Радиоустойчивой бактерии *D. radiodurans* особенно важно иметь эффективные пути репарации ДНК. В её геноме закодированы белки UvrD и Mfd, а также уникальные транскрипционные факторы Gfh1 и Gfh2. В данной работе мы исследовали их влияние на транскрипцию у *D. radiodurans* в системе *in vitro*. Мы показали, что фактор Mfd способствует диссоциации элонгационных комплексов, остановленных на матрице ДНК, в то время как у белка UvrD такой активности зарегистрировано не было. Кроме того, мы обнаружили, что Gfh-факторы усиливают транскрипционные паузы на поврежденных участках ДНК-матрицы и, таким образом, могли бы принимать участие в сопряжении процессов транскрипции и репарации. Для проверки этой гипотезы мы исследуем совместное действие Mfd и UvrD с Gfh-факторами на транскрипцию поврежденных матриц РНК-полимеразой *D. radiodurans*.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-14-01074 и РФФИ № 16-34-60237.

2.2 СИНТЕЗ МОНОМЕРОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ НАНОКОРПУСКУЛЯРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДНК

Баторова Ю.А.

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

Электронный адрес: batorova22@gmail.com

Липосомы и наносомы мицеллярного типа, имеющие жидкую стенку, относят к наиболее эффективным нанокорпускулярным носителям генного материала. Они способны сливаться с мембраной живой клетки и доставлять неповрежденное ДНК внутрь ядра, минуя стадию биоразложения лизосомальными ферментами. Это позволяет использовать их для доставки любых лабильных веществ, к которым относятся не только ДНК, но и пептидные гормоны. Липосомы и полимеросомы мицеллярного типа рассматривают как "универсальную многофункциональную наномедицинскую платформу" целевой доставки лекарств не только для генной терапии, но и для химиотерапии опухолей. Однако все наносомы с жидкой стенкой применимы только для культур клеток, так как обладают весьма существенным недостатком. Они обмениваются содержимым друг с другом и с окружающей тканевой жидкостью, что делает невозможным их использование внутри живого организма. Замедлить межмицеллярный обмен можно частичной химической сшивкой стенки наносом. Весьма удобными сшивающими агентами являются 2-цианакрилаты. Их уникальность обусловлена способностью к анионной полимеризации под влиянием слабых нуклеофилов, к которым относятся белки, амины, и следы воды. Они не требуют радикального инициирования, которое приводит к деструкции содержимого наносом, а образующиеся поли-2-цианакрилаты способны к биодegradации.

Целью работы является синтез поверхностно-активных эфиров 2-цианакриловой кислоты и получение на их основе наносом для генной терапии.

Синтезированы поверхностно-активные эфиры трех типов.

Первый тип содержит один жирный гидрофобный радикал и одну активную цианакрилатную группировку. Для его синтеза использовали неионогенное ПАВ - гексадециловый эфир полиэтиленгликоля со средней степенью полимеризации $n=10$ "Brij C10".

Второй тип получен на основе трехатомного жирного спирта - моносorbitанстеарата "Span 60". Он содержит три сшивающих цианакрилатных группировки в гидрофильной части молекулы.

Третий тип получен из 2,4,7,9-тетраметил-5-децин-4,7-диола, имеет два коротких гидрофобных радикала, два цианакрилатных заместителя и тройную связь в гидрофильной части молекулы.

Полученные 2-цианакриловые эфиры использовали в синтезе полимеросом с частично-сшитой стенкой. В зависимости от типа мономера и полимеризационной среды диаметр полимеросом можно контролировано изменять в интервале от 5 до 700 нм.

2.3 МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА КИСЛЫХ ДРЕНАЖНЫХ ВОД ЗОЛОТОДОБЫВАЮЩЕЙ ШАХТЫ "КОМСОМОЛЬСКАЯ" КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Белецкий А.В.¹, Кадников В.В.¹, Ивасенко Д.А.², Марданов А.В.¹

¹ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Москва

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

Электронный адрес: mardanov@biengi.ac.ru

Дренажные воды, образующиеся в районах добычи металлов, часто характеризуются низким рН вследствие окисления остаточных сульфидов, высоким содержанием растворенных металлов, и представляют собой экстремальные местообитания. Мы проанализировали микробное сообщество дренажных вод в районе хвостохранилища золотодобывающей шахты "Комсомольская" Кемеровской области методами метагеномики. Вода имела кислый рН (2.29), Eh +529, температуру 26°C. Химический анализ воды выявил высокие концентрации металлов и металлоидов, прежде всего железа (6088 мг/л), мышьяка (800 мг/л), магния (385 мг/л), алюминия (504 мг/л) и цинка (136 мг/л). Для анализа микробных сообществ анализировали пробы воды и донного осадка. Воду фильтровали последовательно через фильтры с диаметром пор 0.45 мкм и 0.22 мкм. Фракция 0.45 мкм вероятно представлена микроорганизмами, связанными с крупными частицами, а фракция 0.22 мкм представлена планктонными микроорганизмами. Микробное сообщество воды включает в основном серо- и железобактерии, причем состав литоавтотрофов в планктонной фазе и на частицах различается - обнаруженные на частицах *Ferrimicrobium*, *Sulfobacillus* и *Ferroplasma* присутствуют в воде в меньших количествах, а их место занимают *Acidithiobacillus*. В донном осадке помимо железо- и серо-окисляющих бактерий мы обнаружили новую "неклассифицируемую" линию бактерий, которая составляла наиболее многочисленную часть сообщества. Для геномной характеристики этой новой линии мы просеквенировали полный метагеном микробного сообщества донного осадка. Секвенирование метагенома проводили по технологии пиросеквенирования. Метагеномный анализ позволил получить почти полный "композиционный геном" новой линии бактерий, имеющий размер около 2.4 млн нт и охарактеризовать пути ее метаболизма. Анализ филогенетического положения новой бактерии на основе последовательностей гена 16S рРНК и конкатенированных последовательностей генов рибосомных РНК позволил отнести ее к классу дельта-протеобактерий, в котором она, вероятно, представляет новый порядок.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-14-01016.

2.4 СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПО 2 И 6 ПОЛОЖЕНИЯМ ПУРИНОВОГО ОСНОВАНИЯ

Берзина М.Я., Елецкая Б.З.

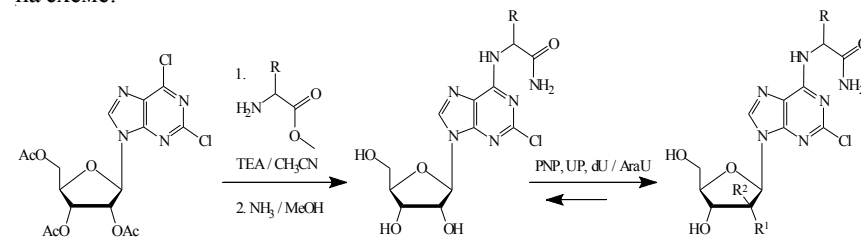
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: berzina_maria@mail.ru

В настоящее время идет активный поиск новых высокоэффективных соединений-антиметаболитов, способных оказывать направленное цитотоксическое действие на опухолевые клетки. Одним из перспективных направлений такого поиска является модификация пуриновых и пиримидиновых оснований, входящих в структуры ДНК и РНК, - потенциальных ингибиторов синтеза и репарации ДНК. Хорошо известны в клинической практике терапии лимфобластных заболеваний системы кроветворения препараты Кладрибин (2-хлор-2'-дезоксиаденозин) и Неларабин (9-β-D-арабинофуранозил-6-O-метилгуанин). Нами был получен ряд новых нуклеозидов рибо-, дезоксирибо- и арабино- рядов, модифицированных природными оптически активными аминокислотами по 6 положению 2-хлорзамещенного пурина. Мы ожидаем, что при попадании в клетки такие соединения могут подвергаться дальнейшей модификации с образованием активных форм, участвующих в синтезе ДНК.

Химико-ферментативный способ синтеза таких нуклеозидов представлен на схеме:



где R - остаток аминокислоты;

R1=R2=H для дезоксирибозы,

R1=H и R2=OH для арабинозы, соответственно;

PNP - пуридиннуклеозидфосфорилаза;

UP - уридинфосфорилаза; dU - 2-деоксиуридин;

AraU - 1-β-D-арабинофуранозилурацил.

Замену остатка рибозы на арабинозу и 2-деоксирибозу осуществляли по реакции трансгликозилирования, осуществляемой генно-инженерными ферментами нуклеозидфосфорилазами *E. coli*. Цитотоксичность нуклеозидов была изучена на клетках Т-лимфобластного лейкоза линии U-937. Наиболее перспективным оказался 9-(β-D-арабинофуранозил)-6-(N^α-L-сериламидо)-2-хлорпуридин, проявивший цитотоксичность на уровне Неларабина, что отражено в патенте RU2563257C1.

2.5 АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОБОГАЩЁННОСТИ ЛОКУСОВ, ВЫЯВЛЕННЫХ ПО ДАННЫМ GWAS КАК АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Быкадоров П.А., Фридман М.В., Макеев В.Ю.

Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Москва

Электронный адрес: platon.work@gmail.com

GWAS (метод полногеномного анализа ассоциаций) сам по себе не учитывает прямого влияния обнаруженных SNP на экспрессию тех или иных генов и белков. Метод expression quantitative trait loci (eQTL) предполагает анализ влияния геномных SNP на уровень экспрессии генов организма. Поэтому мы сначала выделили локусы, наиболее достоверно выявляемые в различных исследованиях GWAS рассеянного склероза, затем проанализировали, какие из находящихся в них SNP являются eQTL и для каких генов, после чего определили набор перепредставленных функций для этого списка генов.

Мы использовали данные о том, eQTL каких генов являются эти SNP для нервной ткани и крови, и оценили функциональную обогащённость этих генов по классификации GO. Списки обогащены генами, влияющими на процессинг и презентацию антигенов с участием MHC II класса, и на вспомогательные по отношению к этим функциям процессы и структуры.

Полученные результаты сходны для eQTL нервной ткани и eQTL крови. eQTL практически для всего списка перепредставленных функций находятся в локусе chr14:105748129-105800631, рядом с которым предположительно могут находиться гены тяжёлой цепи иммуноглобулинов. Перепредставленность соответствующих функций для крови связана с влиянием SNP из этого локуса на экспрессию генов гистосовместимости (HLA-DMA, HLA-DOB, HLA-DQA1, HLA-DQA2, HLA-DQB1, HLA-DRB1), а также гена PSMB9, в чьи функции входит сигнальный путь T-клеточного рецептора. В нервной системе eQTL этого локуса влияют на экспрессию почти того же набора генов гистосовместимости (HLA-DOB, HLA-DQA1, HLA-DQA2, HLA-DQB1).

Предполагается поиск функциональных объяснений выявленных закономерностей, а также выделение других заболеваний, сходных по механизмам, с точки зрения нашего подхода, с РС.

2.6 ПОИСК МИШЕНЕЙ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ БАКТЕРИЙ МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

Гаранина И.А., Фисунов Г.Ю.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

Электронный адрес: irinagararina24@gmail.com

Транскрипционные факторы (ТФ) - белки, которые регулируют транскрипцию определенных генов (мишеней) путем связывания с последовательностями ДНК в районе старта транскрипции. Несмотря на то что существует множество экспериментальных методов для поиска мишеней ТФов, у большинства бактерий, в том числе таких опасных патогенов человека и сельскохозяйственных животных и растений, как молликуты, пути транскрипционной регуляции изучены очень слабо. Целью данной работы было разработать и применить на бактериях класса молликут метод поиска транскрипционных факторов и их мишеней, не использующий дополнительную информацию о других бактериях.

С помощью метода машинного обучения "случайный лес" мы построили модель, предсказывающую силу промотера по его последовательности - всего было использовано 7 характеристик промотера. Для обучения модели мы использовали уже опубликованные нами экспериментальные данные РНК-секвенирования 5'-обогащенной РНК двух видов молликут: *Mycoplasma gallisepticum* и *Acholeplasma laidlawii*, по ним были определены силы промотеров и координаты стартов транскрипции. Наша модель описывает 92% дисперсии силы промотера и предсказывает силу промотера с точностью 95%. По разнице в предсказанной и экспериментальных силах промотеров были найдены потенциальные мишени транскрипционных факторов, используя которые были предсказаны регулоны в изучаемых бактериях. Построенные с помощью нашего метода регулоны частично совпали с уже известными регулонами, а так же были обнаружены новые, в основном видоспецифичные. Таким образом, нам удалось разработать эффективный вычислительный метод для расшифровки путей транскрипционной регуляции, который помогает находить регулоны в плохо изученных и сильно отличающихся от модельных организмов бактериях.

2.7 ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕСУСЦИТАЦИИ *Mycobacterium tuberculosis*

Григоров А.С.^{1,2}, Салина Е.Г.³, Мазурова А.С.², Капрельяниц А.С.³,
Ажикина Т.Л.²

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

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

³Институт биохимии им А.Н. Баха РАН, Москва
Электронный адрес: artgrigorov@gmail.com

Жизненный цикл микобактерии в инфицированном организме проходит несколько стадий: заражение организма и развитие болезни; переход в латентное состояние, которое характеризуется наличием жизнеспособных бактерий со сниженным уровнем репликации и устойчивостью к антибиотикам; выход из латентного состояния и повторное развитие заболевания, так называемый, рецидивирующий туберкулёз. Спектр проявления инфекции зависит как от особенностей иммунного ответа хозяина, так и от способностей микобактерий противостоять этому ответу, что требует понимания молекулярных механизмов персистенции и реактивации возбудителя (ресусцитации) в организме-хозяине.

Целью нашего исследования была характеристика изменений транскриптома *M. tuberculosis*, происходящих при ресусцитации до начала размножения микобактерий. Ранее нами было показано, что покоящиеся формы микобактерий характеризуются почти полной транскрипционной репрессией. В качестве модели была использована модель состояния покоя *M. tuberculosis*, в которой бактерии продолжительное время культивируют в среде, не содержащей ионов калия. Нами проведено полномасштабное секвенирование транскриптома (RNA-seq) на платформе Illumina в динамике ресусцитации и показано, что выход из состояния покоя начинается с наработки мРНК транскрипционных регуляторов и белков, моделирующих клеточную стенку микобактерий.

Работа поддержана Программой Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология".

2.8 ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *TRI9* И *TRI14* У ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM*, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ТРИХОТЕЦЕНОВЫЕ МИКОТОКСИНЫ

Звездина Ю.К., Стахеев А.А., Завриев С.К.

Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН

Электронный адрес: stakheev.aa@gmail.com

Аскомицеты рода *Fusarium* наносят существенный ущерб сельскому хозяйству, а также являются серьезной угрозой для здоровья человека и животных, поскольку являются продуцентами целого спектра вторичных токсических метаболитов - микотоксинов. Наиболее распространёнными и опасными являются токсины трихотеценовой группы, представляющие собой сесквитерпеноидные соединения, разделяемые на 4 основных типа (A-D) в зависимости от химического строения. Основными продуцентами трихотеценовых токсинов являются виды *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*. Кроме того, значительную опасность представляют недавно выделенные в качестве самостоятельных видов *F. langsethiae*, *F. sibiricum*, *F. ussurianum*.

Гены, ответственные за синтез трихотеценовых токсинов, сгруппированы в 3 кластера, расположенных на разных хромосомах. Установлено, что в общей сложности 15 генов вовлечено в процесс биосинтеза трихотеценовых токсинов у грибов рода *Fusarium*. Некоторые из этих генов могут быть нефункциональными в зависимости от конкретного вида или штамма. На сегодняшний день функции двух генов (*TRI9* и *TRI14*), входящих в состав основного генного кластера, не установлены. Задача структурной и функциональной характеристики генов *TRI9* и *TRI14* усложняется отсутствием информации в международных базах данных относительно их сходства с какими-либо генами других организмов.

В рамках настоящего исследования были сконструированы универсальные праймеры, обеспечивающие амплификацию последовательностей генов *TRI9* и *TRI14* и прилегающих к ним участков. В результате впервые были определены структуры исследуемых генов у видов *F. cerealis*, *F. langsethiae*, *F. ussurianum* и *F. sibiricum*. С помощью методов компьютерного моделирования предсказаны структуры белков, кодируемых этими генами. Выявлены конститутивные различия в нуклеотидных и предсказанных белковых последовательностях у видов, характеризующихся различными профилями продуцируемых микотоксинов. Полученные данные послужат основой для дальнейших исследований структуры и функций этих генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №16-34-01369.

2.9 ИССЛЕДОВАНИЕ БИОГЕНЕЗА пиРНК В ГЕРМИНОГЕННЫХ ОПУХОЛЯХ ЯИЧКА

Кондратьева С.А., Гайнетдинов И.В., Скворцова Ю.В., Ажикина Т.Л.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: sofia.a.kondr@gmail.com

Белки подсемейства PIWI из семейства белков-аргонатов экспрессируются в основном в гонадах и способны связывать особый класс коротких РНК - пиРНК. Piwi-домен белков этого семейства схож с РНКазой H и обеспечивает каталитическую активность, а N-концевой PAZ-домен отвечает за взаимодействие с другими белками и вовлечение PIWI в биогенез пиРНК, что обеспечивает сайленсинг ретроэлементов.

Ранее открытая нами короткая изоформа белка PIWI2 (60kDa), экспрессирующаяся только в клетках герминогенной опухоли яичка (testicular germ cell tumor, TGCT), усечена как по Piwi, так и по PAZ-доменам.

Целью работы было исследование репертуара пиРНК в герминогенных опухолях, экспрессирующих короткую изоформу PIWI2. Для анализа были взяты 6 TGCT (3 семиномы и 3 несеминомы) и прилегающие к опухоли ткани яичка (представляющие собой карциному *in situ*, CIS), а также нормальная ткань яичка. Мы показали, что экспрессия белков семейства PIWI коррелирует с экспрессией маркеров герминальных клеток (DDX4, DAZL) с высоким коэффициентом корреляции (0.96 и 0.95, соответственно), а уровень экспрессии указывает на отсутствие стволовых герминальных клеток в опухолях и сильное уменьшение их количества в CIS образцах. Секвенирование и анализ библиотек коротких РНК из тканевых образцов выявил экспрессию миРНК - маркеров TGCT/CIS (miR-302, miR-367, miR-371-373). При анализе пиРНК выявлена следующая закономерность: чем ниже уровень сперматогенеза, тем ниже представленность пиРНК в кластерах, расположенных в мобильных элементах, и ниже уровень первичного (присутствие урацила в первом положении, 1U bias) и вторичного биогенеза пиРНК (присутствие аденина в десятом положении, 10A bias). Таким образом, биогенез пиРНК снижается при образовании герминогенных опухолей яичка уже на промежуточной CIS стадии. Полученные данные коррелируют с экспрессией в TGCT/CIS короткой изоформы PIWI2, не имеющей функциональных доменов, требуемых для осуществления биогенеза пиРНК.

Работа поддержана Программой Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и грантом РФФИ № 16-34-01193_мол_а.

2.10 ЭНХАНСЕР EN1A D. MELANOGASTER СОДЕРЖИТ КОММУНИКАТОРНЫЙ ЭЛЕМЕНТ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЙ ДИСТАНЦИОННЫЕ ЭНХАНСЕР - ПРОМОТОРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Молодина В.В., Мельникова Л.С., Померанцева Е.А., Георгиев П.Г.

Институт биологии гена РАН, Москва

Электронный адрес: molodina_varvara@mail.ru

Одной из ключевых особенностей энхансеров является способность специфично активировать транскрипцию гена-мишени, иногда удалённого от них на расстоянии, достигающие десятков и даже сотен т.п.н. Однако механизмы поддержания специфичных дистанционных взаимодействий между энхансерами и промоторами остаются почти неизученными. Известно, что в ряде случаев в обеспечении коммуникации между энхансером и промотором участвуют цис-регуляторные последовательности ДНК, найденные в промоторных областях эукариотических генов.

Целью представленной работы являлось исследование нового энхансера En1A, обнаруженного в интроне неизученного гена CG3777, расположенного на X хромосоме. Нами был создан ряд рекомбинантных генетических конструкций, включающих отдельные последовательности En1A. В качестве модельной системы использовался ген *yellow*. Было показано, что энхансер En1A имеет модульное строение. В составе En1A мы обнаружили активаторный и коммуникаторный элементы. Активаторный элемент способен функционально заменять энхансеры тела и крыльев гена *yellow*, т.е. стимулировать транскрипцию в соответствующих кутикулярных структурах. Коммуникаторный элемент необходим для взаимодействия En1A с промотором гена *yellow* и способен обеспечивать дистанционную GAL4-зависимую активацию транскрипции.

Полученные данные доказывают, что новый энхансер En1A имеет модульное строение. Результаты работы свидетельствуют в пользу предположения, что регуляторные области различных генов имеют модульное строение и включают в свой состав активаторные элементы, с которыми связываются транскрипционные факторы, иницирующие и поддерживающие эффективную транскрипцию, и элементы-коммуникаторы, с которыми связываются белки, обеспечивающие пространственное сближение энхансера и промотора.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №14-14-01067.

2.11 РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМОВ АНАЛИЗА ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ПОИСКА СОМАТИЧЕСКИХ ИНСЕРЦИЙ РЕТРОЭЛЕМЕНТОВ

Нугманов Г.А., Комков А.Ю., Минервина А.А., Мамедов И.З., Лебедев Ю.Б.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: nugazyi@gmail.com

Поиск и выявление соматических инсерций ретроэлементов в геноме человека имеет большое фундаментальное значение для понимания механизмов формирования геномной варибельности и функциональной пластичности клеток взрослого организма. Наиболее эффективным методическим подходом для выявления соматических инсерций является высокопроизводительное секвенирование нового поколения (HTS - High-Throughput Sequencing). Помимо постановки биологического эксперимента немаловажную роль играют биоинформатические методы анализа полученных данных, без которых решение данной задачи невозможно.

Целью данного исследования является разработка биоинформатического алгоритма для поиска соматических инсерций в массивах данных HTS. В качестве исходных данных для разработки алгоритма были использованы библиотеки, полученные из нескольких различных тканей мозга и сердца для нескольких человеческих индивидов. Процесс разработки нового подхода включал в себя создание большого количества статистически и биологически обоснованных фильтров для уменьшения ошибок секвенирования парных ридов и картирования их на референсный геном человека. Кроме того, алгоритм включает точный подсчёт молекулярных идентификаторов с учётом ошибок ПЦР и секвенирования для определения числа клеток, содержащих соматическую инсерцию.

Проверка корректности алгоритма осуществлялась на искусственно сконструированных массивах данных. В результате биоинформатической обработки данных HTS были выявлены соматические инсерции ретроэлементов в различных тканях человека. Для сравнения чувствительности различных методов пробоподготовки библиотек для секвенирования проведены эксперименты с последовательной перевыборкой уменьшающихся подмножеств секвенсов ридов. Показано, что методика, использующая геномную нормализацию, существенно увеличивает эффективность обнаружения соматических инсерций ретроэлементов.

2.12 АНАЛИЗ ПРОФИЛЕЙ ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОМОТОРОВ *E. COLI* С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

Орлов М.А.¹, Рясик А.А.¹, Зыкова Е.А.¹, Ермак Т.В.², Сорокин А.А.¹

¹Институт биофизики клетки РАН, Пушкино

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск
Электронный адрес: orlovmikhaianat@gmail.com

Совершенствование методов секвенирования обеспечивает доступ к беспрецедентным по объёму данным о первичной структуре ДНК. При этом в случае тотального, *de novo* и т.д. секвенирования имеются лишь ограниченные данные об изучаемых геномах. Это определяет необходимость использования алгоритмов машинного обучения при аннотировании. Традиционно используемые алгоритмы анализируют первичную структуру ДНК и способны успешно предсказывать кодирующие, но не регуляторные области генома (особенно промоторы). В этом случае более перспективными считаются алгоритмы, использующие также физические свойства ДНК, поскольку именно последние направляют ход процессов ДНК-белковых взаимодействий. Более того, наиболее эффективно использование различных физических и текстовых характеристик одновременно.

В данной работе для промоторов, "непромоторов" (последовательности на расстоянии не менее 300 п.о. от ТСТ), промоторных островков и генов *E. coli* (штамм K12) из базы данных RegulonDB версии 8.5 получены профили физических свойств, представляющие все основные группы: электростатический потенциал, вызванная суперспирализацией дестабилизация дуплекса (SIDD, Stress-Induced Duplex Destabilization) и данные модели динамических свойств открытых состояний ДНК, а также GC-состав в качестве текстовой характеристики.

Для каждого из наборов профилей, а также набора, полученного на основе всех 4-х характеристик с использованием PCA (88%), была проведена кластеризация ("обучение без учителя") и оценена способность алгоритмов "обучения с учителем" (Naive Bayes и Random Forest) различать последовательности разного типа. Кластерный анализ выполнен по методике Уорда с выделением наиболее устойчивых группировок. Для ряда кластеров установлено наличие характеристических элементов профилей и обогащение функциональными классами соответствующих генов (по GeneOntology). Показано, что совместное использование физических свойств промоторных последовательностей при кластерном анализе позволяет более эффективно отличать их от последовательностей ДНК других типов. Бинарные классификаторы Naive Bayes и Random Forest показали очень высокую точность предсказаний для пар "промоторы - последовательность другого типа" кроме случая разделения промоторов и непромоторных областей.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-37-00303 мол_а.

2.13 ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭВОЛЮЦИИ РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ И ПРОМОТОРА ЭВОЛЮЦИОННО КОНСЕРВАТИВНОГО ГЕНА *Dras1*

Сивопляс Е.А.¹, Сорокина С.Ю.², Барсуков М.И.¹, Чекунова А.И.², Кутузова Н.М.¹, Куликов А.М.²

¹Московский педагогический государственный университет, Москва

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Электронный адрес: sivorplyas-ekater@mail.ru

Критические периоды в эволюционной истории популяции, вызванные резкими изменениями окружающей среды и сопровождающиеся физиологическим и геномным стрессом, часто соответствуют точкам бифуркации на филогенетическом древе видов. Гены *Ras* -семейство консервативных генов, кодирующих белки, относящихся к малым G-белкам (малые ГТФазы), играющих роль "молекулярных переключателей". Ген *Dras1* является универсальным переключателем от рецепторов к транскрипционным факторам. Мутации в этом гене часто приводят к канцерогенезу. Высококонсервативный ген *Dras1* экспрессируется у всех эукариот от дрожжей до человека. Показана смена предпромоторной области гена *Dras1* у дрозофил группы *virilis* по сравнению с *D.melanogaster*. У представителей обеих групп видов ген *Dras1* расположен на противоположных цепях ДНК и граничит со стороны промотора с различными наборами генов, что указывает на границу инверсионной перестройки в районе промотора данного гена. Размер межгенного спейсера со стороны промотора *Dras1* варьирует в пределах 259-268 п.н. у видов группы *D.melanogaster* и 1177-2180 п.н. у видов группы *D.virilis*. Точка старта транскрипции удалена от открытой рамки считывания гена на 750-800 п.н. у обеих групп видов. Также найдены фрагменты концевых повторов мобильных элементов в предпромоторной области. Произошла полная смена регуляторной области и промотора у высококонсервативного гена *Dras1*. Известные мутации данного гена, связанные с повреждением промотора, являются летальными или, по крайней мере, приводят к значительным морфо-физиологическим нарушениям. Такие мутации в природных условиях существуют исключительно в гетерозиготном состоянии и вытесняются из популяции. Тем не менее мы наблюдаем процесс полной смены регуляторной и промоторной областей гена как минимум в трех случаях в ходе дивергенции видов дрозофил разной степени родства. Это показатель высокой скорости эволюции, так как в кратчайшие сроки было восстановлено функционирование гена, при инактивации которого появляется леталь.

СЕКЦИЯ 3 СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ, ЛИПИДОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ

3.1 ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ

Глыбин А.В., Буравлева Е.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоорганической химии, Москва
Электронный адрес: adenylatcyclase@rambler.ru

Регуляторные пептиды растений (РПР) являются группой низкомолекулярных биорегуляторов разнообразных процессов жизнедеятельности растений, таких как морфогенез, рост и развитие вегетативных органов, деление клеток, формирование защитных реакций.

Для изучения физиологической активности ряда РПР были разработаны биотесты, позволяющие установить влияние РПР в широком диапазоне концентраций на рост главного и боковых корней проростков крестоцветного растения *Arabidopsis thaliana*. В результате тестирования ряда РПР, включая наиболее изученный пептид CLV3p из *A.thaliana*, показана немономонная концентрационная зависимость физиологической активности пептидов.

Обнаружено, что CLV3p, в норме экспрессируемый со своим рецептором CLV1 только в области побега и контролирующей пролиферацию побеговой апикальной меристемы, заметно влияет на скорость роста главного корня и образование боковых корней. Показано, что пептиды PpCLE1 и PpCLE2 из мха *Physcomitrella patens*, гомологичные CLV3p, также влияют на рост корней *A.thaliana*, несмотря на принадлежность данных растений к различным отделам.

Недавно было установлено, что в корнях *A.thaliana* соотношение между клеточной пролиферацией и дифференцировкой модулируется балансом активных форм кислорода (АФК) между зоной деления и зоной роста [1]. Примечательно, что добавление CLV3p к водным растворам NaHCO₃, в которых постоянно образуются АФК, изменяет параметры свободно-радикальных реакций, оцениваемых измерением интенсивности стимулированного излучения фотонов из таких растворов. Эффект CLV3p в широком ряду концентраций изменяется также немонотонно, ингибируя хемилюминесценцию наиболее интенсивно в тех концентрациях, которые наиболее эффективно тормозят рост основного корня и стимулируют рост боковых (10^{-7} - 10^{-8} М и 10^{-14} - 10^{-16} М). Предполагается, что стабильное неравновесное (электронно-возбужденное) состояние в бикарбонатных системах обеспечивается спонтанным разделением зарядов [2]. Такое состояние может быть высокочувствительным к воздействию низкоинтенсивных факторов физической и химической природы, действующих на структурно-динамические процессы в водных системах, включающих и биологические системы, через механизм резонанса.

Литература

1. Tsukagoshi, H., et al. (2010). Cell 143, 606-616.
2. Voikov, V.L., et al. (2012). Russ. J. of Physical Chem. A, 86, 1407-1415.

3.2 ЛИЗИЛОКСИДАЗА КАТАЛИЗИРУЕТ ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ АМИНОГЛИКОЗИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ

Ларионова Т. Д., Калиновский Д. В., Пестов Н. Б.

Институт биорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: iceberg987@yandex.ru

Аминогликозиды - антибиотики, содержащие аминсахариды и проявляющие бактерицидное действие в отношении многих бактерий. Известно три механизма резистентности микроорганизмов к аминогликозидам: мутации в рибосомных белках, затруднение транспорта через клеточную мембрану, а также инактивация путем фосфорилирования. Однако механизмы устойчивости к антибиотикам могут быть более разнообразными, чем представлялось ранее.

Лизилоксидаза (LOX) - Cu-зависимый фермент, относящийся к классу аминоксидаз, катализирующий окислительное дезаминирование первичных аминов с образованием альдегидов. Гены LOX имеются у большинства животных и некоторых грибов. Кроме того, недавно было обнаружено, что горизонтальный перенос способствовал распространению гомологов LOX среди нескольких групп эубактерий (преимущественно дельтапротеобактерий и актиномицетов), а также и отдельных архей.

Мы показали, что LOX аорты барана способна катализировать окислительное дезаминирование многих аминогликозидов, включая канамицин, гентамицин, амикацин и капреомицин. Активность фермента определялась по высвобождению перекиси водорода, сопряженной с окислением 10-ацетил-3,7-дигироксифеноксазина во флуоресцентный резорурфин в присутствии пероксидазы хрена. Примечательно, что аминогликозиды не являются субстратами для других аминоксидаз млекопитающих, таких как моноаминоксидаза и семикарбазид-чувствительная аминоксидаза.

Далее, мы оптимизировали продукцию в *E. coli* и выделение рекомбинантной LOX галофильной археобактерии *Haloterrigena turkmenica* (htuLOX). Показано, что в отношении аминогликозидов htuLOX существенно более эффективна, чем фермент из аорты барана.

Таким образом, окислительное дезаминирование при помощи LOX может быть еще одним механизмом, обеспечивающего устойчивость патогенных организмов к антибиотикам. Кроме того, нельзя исключать, что побочные эффекты многих аминогликозидов (например, ототоксичность) также могут быть опосредованы действием лизилоксидазы.

СЕКЦИЯ 4 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

4.1 ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ РАСТВОРОВ КОМПЛЕКСОВ ДНК С *cis*- И *trans*-ДДП

Баталова А. А., Белая И. А., Поляничко А. М., Травкина В. И.,
Чихиржина Е. В.

Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет,
кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров, Санкт-Петербург
Электронный адрес: va.phys@gmail.com

Изучение механизмов воздействия противоопухолевых препаратов на ДНК является актуальной проблемой. Расширение знаний в этой области позволяет совершенствовать уже имеющиеся препараты, снижать их цитотоксичность, повышать эффективность, и накапливать данные для разработки новых лекарственных средств. В настоящее время основой комплексной терапии многих видов рака являются цисплатин и его аналоги.

В работе изучали взаимодействие ДНК с *cis*- и *trans*- изомерами дихлородиаминплатины(II) (ДДП) методом ИК спектроскопии в растворе. Исследования проводили в растворах D₂O и H₂O при молярном соотношении ДДП к нуклеотидам [Pt]/[P] в диапазоне от 1:1 до 150:1. Показано, что связывание ДДП приводит к изменению положения и интенсивности спектральных полос, соответствующих колебаниям связей C=N7, C=NH₂ и C6=O в составе гуанина. В случае комплексов *cis*-ДДП-ДНК также наблюдались изменения других полос: смещение полосы поглощения на 1643 см⁻¹, соответствующей колебаниям связей в кольце тимина, и падение её интенсивности с ростом концентрации платины, смещение полосы на 1698 см⁻¹ в сторону меньших волновых чисел, свидетельствующее об изменении частоты колебаний связи C2=O в тимине. Показано, что связывание *cis*-ДДП сопровождается регистрируемым изменением геометрии сахаро-фосфатного остова, тогда как при связывании *trans*-ДДП соответствующих изменений ИК спектра зарегистрировано не было.

Часть исследований была выполнена с использованием оборудования ресурсных центров СПбГУ "Диагностика функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники" и "Оптические и лазерные методы исследования вещества" Научного Парка СПбГУ. Работа выполнена при финансовой поддержке исследований РФФИ (№ 15-08-06876).

4.2 ДЕЙСТВИЕ ТОКСИНОВ ИЗ ЯДОВ ЗМЕЙ НА ПОТЕНЦИАЛУПРАВЛЯЕМЫЕ КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ

Баркова Д.В., Шелухина И.В., Кузьменков А.И., Кудрявцев Д.С., Василевский А.А., Феофанов А.В., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: daria.barkhova@gmail.com

Калиевые каналы имеют особенно важное значение при формировании мембранного потенциала, модуляции секреции гормонов, функционировании эпителии и в затухании возбуждающих сигналов. В настоящее время известно более семидесяти генов, кодирующих субъединицы белков, формирующих калиевые каналы. В настоящее время принята классификация делит K^+ -каналы следующим образом: 1) потенциалуправляемые K^+ -каналы; 2) Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы; 3) каналы обратного выпрямления; 4) "Leaky"-каналы.

Потенциалуправляемые каналы (K_v) являются одним из самых разнообразных семейств мембранных белков. Некоторые представители данной группы связаны с функционированием иммунной системы и развитием аутоиммунных заболеваний. В фокусе нашего исследования оказался потенциалуправляемый калиевый канал $K_v1.3$. Каналы данного типа являются важными регуляторами активности Т-лимфоцитов, ответственными за клеточную пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и инфильтрацию, в связи с чем они представляют возможную мишень для селективной иммуномодуляции. Более того, актуальным вопросом является возможность использования K_v каналов при диагностике и лечении некоторых онкологических заболеваний.

С помощью методов электрофизиологии и флуоресцентной микроскопии нами было проведено исследование нескольких лигандов $K_v1.3$: а) β -бунгаротоксина - компонента яда аспидовых змей *Bungarus multicinctus*; б) фракций яда змей семейства *Viperidae*, проявляющих ингибирующую активность в отношении $K_v1.3$, а также фосфолипазную активность; в) флуоресцентных аналогов токсина OSK1, полученных генно-инженерным путем.

В отличие от других блокаторов потенциалуправляемых калиевых каналов для развития эффекта β -бунгаротоксина требуется значительное время (до 20 минут), в течение которого ингибирование развивается постепенно. Это может быть использовано в дальнейшем для регулирования степени блокирования канала. Фракции яда змей семейства *Viperidae* проявляют множественную активность, в том числе фосфолипазную, поэтому требуются дальнейшие исследования, очистка и выделение чистого компонента, вызывающего снижение активности калиевых каналов.

4.3 ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА ПРОТЕКАНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ "КАТЯЩИМСЯ КОЛЬЦОМ" С ДНК ПОЛИМЕРАЗАМИ Bst exo⁺ И Vent exo⁺

Машиков О.И., Сахабутдинова А.Р., Гарифутдинов Р.Р.

Институт биохимии и генетики Уфимского НЦ РАН, Уфа
Электронный адрес: mashkov.sci@gmail.com

Наночастицы золота (НЧЗ) находят все более широкое применение в биологических исследованиях. Одним из них является использование НЧЗ в составе ПЦР-смесей с целью повышения эффективности этой реакции [Hwang et al., 2013]. В то же время имеются лишь единичные работы об особенностях протекания реакций изотермической амплификации в присутствии НЧЗ [Li et al., 2010; Tian et al., 2014].

Нами исследовано протекание амплификации по типу "катящегося кольца" (RCA, rolling circle amplification) в присутствии НЧЗ, стабилизированных цитратом натрия (ст-НЧЗ) и BSPP (BSPP-НЧЗ). Была получена искусственная одноцепочечная кольцевая ДНК размером 50 нт, которую использовали в качестве матрицы в реакции RCA с двумя праймерами (реакция рамификации). Оказалось, что положительное влияние НЧЗ на RCA (повышение эффективности, чувствительности) имеет концентрационный максимум. При этом ДНК полимеразы Bst exo⁺ активна до концентрации 20-30 нМ обоих типов НЧЗ, а Vent exo⁺ ингибируется НЧЗ уже свыше 10 нМ. В присутствии ст-НЧЗ чувствительность реакции с Bst exo⁺ повышается на порядок и составляет 10 копий матрицы, для BSPP-НЧЗ изменение чувствительности не обнаружено (сохраняется на уровне 10² копий). Для Vent exo⁺ чувствительность существенно ниже (10⁶ копий). В целом также обнаружено, что присутствие НЧЗ ингибирует образование неспецифических продуктов амплификации.

Литература

1. Hwang S.H., Im S.G., Hah S.S., Cong V.T., Lee E.J., Lee Y.S., Lee G.K., Lee D.H., Son S.J. (2013). Effects of upconversion nanoparticles on polymerase chain reaction. *PLoS one*, 8(9), e73408.
2. Li J., Deng T., Chu X., Yang R., Jiang J., Shen G., Yu R. (2010). Rolling circle amplification combined with gold nanoparticle aggregates for highly sensitive identification of single-nucleotide polymorphisms. *Analytical chemistry*, 82(7), 2811-2816.
3. Tian L., Cronin T. M., Weizmann Y. (2014). Enhancing-effect of gold nanoparticles on DNA strand displacement amplifications and their application to an isothermal telomerase assay. *Chemical Science*, 5(11), 4153-4162.

4.4 НОВЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА КОНДИЦИОНИРОВАННЫХ СРЕД

Петровская М.А.

Тверской государственной медицинской университет, Тверь

Электронный адрес: biologiatgma@mail.ru

В последнее десятилетие кондиционированные среды (КС), т.е. питательные среды, содержащие продукты жизнедеятельности предварительно культивированных в них клеток, привлекают все большее внимание в качестве потенциальных лекарственных средств для регенеративной медицины. Однако, из-за чрезвычайно низкой концентрации целевых биологически активных веществ существует настоятельная необходимость разработки новых подходов для оценки качества КС. Одним из возможных способов комплексной характеристики среды может стать кристалломорфологический метод, основанный на анализе различий количества и формы кристаллов в зависимости от химического состава КС. Целью данной работы являлся сравнительный анализ кристалломорфологических картин кондиционированных сред, полученных от контаминированных и неконтаминированных клеточных культур.

В работе использовали КС, полученные после культивирования первичных преадицитов. Кристаллизацию среды инициировали добавлением спиртового раствора нингидрина. В ходе последующего микроскопирования оценивали количество, форму и размер образовавшихся кристаллов. Кристалломорфологическая картина свежей питательной среды представлена крупными полусферолитами с прозрачными тонкими лучами неправильной формы в виде пластинок слюды. Между лучами располагались гранные формы кристаллов со ступеньками роста второй фазы в центре кристалла. В КС, полученной после 3-дневного культивирования клеток, кристаллы росли в общей форме полусферолитов. Косо изогнутые лучи исходили по 6-7 из центра кристаллизации, образуя ветви второго порядка. Боковые грани лучей имели сложную форму в виде тонких прозрачных пластинок, расположенных под углом 30°. В КС, полученной после 7-дневного культивирования клеток, кристаллы также имели форму полусферолитов, но с игловидными переплетающимися лучами первого, второго и третьего порядков разной длины. В КС, полученной от контаминированной микоплазмой культуры, обнаруживались преимущественно дендриты с гранными формами. В кристалломорфологической картине КС от контаминированной культуры, прошедшей обработку антибиотиком, преобладали неразросшиеся ставролиты. Таким образом изменение химического состава кондиционированной среды по мере культивирования клеток отражается на габитусе растущих кристаллов, что дает основание использовать кристалломорфологический подход для разработки метода оценки качества кондиционированных сред.

4.5 ПОИСК ОПТИМАЛЬНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛОГА ХОЛЕСТЕРОЛА СРЕДИ ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ С РАЗЛИЧНЫМ ПОЛОЖЕНИЕМ NBD-ГРУППЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С БЕЛКОМ StAR

Тугаева К.В.^{1,2}, Фалетров Я.В.³, Максимов Е.Г.⁴, Случанко Н.Н.¹

¹ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" (Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН)

²Кафедра биохимии, биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

³Белорусский государственный университет, НИИ физико-химических проблем, Минск, Беларусь

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики, Москва

Электронный адрес: kri94_08@mail.ru

Стероидогенный регуляторный белок (StAR) принимает участие в стероидогенезе в клетках надпочечников и половых желез. Известно, что белок StAR способствует переносу холестерина к внутренней мембране митохондрий, однако на сегодняшний день полный механизм связывания (в т.ч. ориентация молекулы холестерина) и переноса холестерина этим белком далек от понимания.

В настоящее время основным инструментом в изучении особенностей взаимодействия белка StAR с холестерином является его коммерческий флуоресцентный аналог 22NC с 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD)-группой при 22 атоме углерода. Однако не понятно, оптимален ли такой аналог, и как положение NBD-группы может влиять на связывание с белком. В данной работе мы изучили взаимодействие рекомбинантного StAR, полученного по методике, разработанной в нашей лаборатории, с рядом флуоресцентных аналогов холестерина с различным положением NBD-группы: при 20м (стереоизомеры 20NP α и 20NP β), 22м (22NC), 25м атоме углерода (25NC), и вместо -ОН группы при 3-м атоме углерода (3NC).

Квантовый выход флуоресценции NBD-группы увеличивается при попадании в гидрофобное окружение, что облегчает детекцию взаимодействия лигандов с белком. Наибольший отклик по флуоресценции наблюдался при титровании белка StAR лигандом 20NP β , а в случае лигандов 20NP α и 25NC отклик был меньше ответа на добавление коммерчески доступного 22NC, что говорит о влиянии положения NBD-группы в полости молекулы белка на параметры флуоресценции. Отсутствие изменения сигнала флуоресценции при добавлении лиганда 3NC указывает на важность 3-ОН группы для взаимодействия с белком StAR. Эти выводы согласуются с предсказаниями молекулярного встраивания лигандов *in silico* при помощи AutoDock. Взаимодействие StAR/20NP β происходило со стехиометрией близкой к 1:1 и кажущейся Кд около 3 нМ, при этом время жизни флуоресценции 20NP β существенно увеличивалось, а также возрастала термостабильность StAR. Таким образом, охарактеризовано взаимодействие белка StAR с новым лигандом 20NP β , образующийся комплекс представляется перспективным для дальнейших структурных исследований, а также как система для поиска новых природных спектрально неактивных лигандов StAR.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-00331-а.

4.6 ГИДРОФИЛИЗАЦИЯ ЧАСТИЦ НАНОКРЕМНИЯ ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ПРИМЕНЕНИЯ *IN VIVO*

Шаронова Н.В.¹, Ищенко А.А.¹, Смирнова Е.В.², Ягудаева Е.Ю.²

¹Московский технологический университет, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: ninavsharonova@yandex.ru

В рамках такого актуального направления исследований как гибридные (органонеорганические) системы для конструирования функциональных фотонных структур, биосенсоров и бионаноконъюгатов было проведено исследование биоконъюгатов на основе нанокремния и природных фотосенсибилизаторов. Данное исследование входит в задачу создания диагностических и терапевтических наноразмерных конструкций типа "ядро-оболочка" для избирательной (адресной, таргетной) доставки лекарственных препаратов в клетки - мишени.

К примерам наноматериалов и функциональных групп для биологических применений относятся металлы, графен, полупроводниковые частицы (кадмий селен), которые даже при наличии инертных покрытий проявляют цито- и генную токсичности. В то же время частицы нанокремния биотрансформируются организмом, превращаясь в ортокремниевую кислоту.

Для проведения анализа были использованы частицы нанокремния (np-Si), синтезированные термическим обжигом монооксида кремния при температуре 130-180°C. Для защиты поверхности нанокремния была использована термически активированная реакция гидросилилирования. Полученные частицы нанокремния использовали для получения функции распределения частиц по размеру в зависимости от температуры отжига. Получали данные методом малоуглового рентгеновского рассеивания. Максимальный размер исходных частиц нанокремния составлял 4 нм.

Гидрофилизацию поверхности проводили кремофором (PEG-40 Hydrogenated Castor Oil), путем перемешивания раствора наночастиц кремния в гексане с расплавленным кремофором при 32°C, с периодическим озвучиванием в ультразвуковой ванне. Для гидрофилизации использовали разные соотношения np-Si/Cremophor: 1/1; 1/1,5; 1/2.

В результате были получены гидрофилизированные частицы нанокремния с размерами 109, 36, 11 нм соответственно. Таким образом, варьируя соотношение np-Si/Cremophor, можно получать частицы разного размера в зависимости от поставленных целей. Анализ токсичности полученных частиц нанокремния с использованием МТТ-методики на клеточных линиях эритролейкоза K562 показал, что гидрофилизированные частицы нанокремния не обладают токсичностью.

СЕКЦИЯ 5

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЗНАВАНИЯ БИОМОЛЕКУЛ И ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В КЛЕТКЕ

5.1 N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ Т-КАДГЕРИНА ВЛИЯЕТ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ СИГНАЛИЗАЦИЮ ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

Баглай А.И., Балацкая М.Н., Ткачук В.А.

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

Электронный адрес: sasha-baglay@yandex.ru

Давно известна связь липопротеидов низкой плотности (ЛНП) с риском развития атеросклероза. Однако ЛНП не просто поглощаются и накапливаются в макрофагах, но и оказывают сигнальные, гормоноподобные эффекты на гладкомышечные клетки и тромбоциты: стимулируют фосфоинозитидный обмен, активируют фосфолипазу С и вызывают увеличение внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]$). В нашей лаборатории было доказано, что рецептором, который связывается с ЛНП и запускает увеличение $[Ca^{2+}]$, является гликопротеид Т-кад (Т-кад). Однако, до сих пор молекулярный механизм связывания ЛНП и его нетипичного рецептора Т-кад неизвестен. По аналогии с классическим рецептором ЛНП мы предположили, что важную роль в этом взаимодействии играет гликозилирование Т-кад. На основе анализа аминокислотной последовательности установлено 8 сайтов N-гликозилирования Т-кад, а его фактическая молекулярная масса (105 и 130 кДа по данным электрофореза) существенно отличается от расчётной (78 кДа), что говорит в пользу высокой степени гликозилирования Т-кад.

Целью данной работы была оценка степени гликозилирования Т-кад и влияния гликозилирования аспарагина 382 на ЛНП-индуцируемую внутриклеточную сигнализацию.

Для уточнения связи увеличения молекулярной массы Т-кад с его гликозилированием мы выделили белок из мембран клеток, стабильно экспрессирующих Т-кад, и обработали его смесью дегликозилаз. По данным электрофореза молекулярная масса Т-кад после этого уменьшилась на 20-40 кДа, что подтверждает высокую степень его гликозилирования. Для проверки второй гипотезы нами были получены стабильные линии клеток НЕК293, экспрессирующие нативный Т-кад или Т-кад с мутацией в предсказанном сайте N-гликозилирования в третьем кадгериновом домене N382I. Лизаты полученных клеток были проанализированы методом иммуноблоттинга, при этом была получена разница в массах нормального и мутантного Т-кад в 16 кДа. ЛНП-индуцируемая внутриклеточная сигнализация исследовалась с помощью флуоресцентного зонда Fura-2 при добавлении ЛНП к депривированным клеткам; при этом было получено достоверное увеличение мобилизации $[Ca^{2+}]$ в клетках с мутантным Т-кад. Таким образом, впервые было экспериментально подтверждено наличие сайта гликозилирования N382 в третьем домене Т-кад и его значимое влияние на функциональную активность белка как рецептора, а также доказана высокая степень гликозилирования Т-кад.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 14-24-00086.

5.2 ХАРАКТЕРИСТИКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭНДОГЕННЫХ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ, ЭКСПРЕССИРОВАННЫХ В КЛЕТКАХ SH-SY5Y, МЕТОДОМ КАЛЬЦИЕВОГО ИМИДЖИНГА

Гарифулина А.И., Спирина Е.Н., Жмак М.Н., Иванов И.А., Шелухина И.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: garifulinaai@gmail.com

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) - мембранные интегральные белки, относящиеся к семейству G_уs-петельных рецепторов группы лиганд-управляемых ионных каналов. Они образованы пятью трансмембранными субъединицами, формирующими катион-селективный канал. Существуют два подтипа нАХР: нейрональные и мышечные. Нейрональные нАХР ($\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$ и т.д.) широко распространены в нервной системе, где играют важную роль в передаче нервного сигнала. Рецепторы мышечного типа ($\alpha 1(2)\beta 1\delta \epsilon$) присутствуют на постсинаптических мембранах нервно-мышечных контактов. нАХР представляют собой важную терапевтическую мишень; нахождение способов модуляции их активности играет важную роль в борьбе с такими заболеваниями как: болезни Альцгеймера, Паркинсона, шизофрения, миастении.

Определение специфичности рецепторов разных подтипов к лигандам проводилось методом кальциевого имиджинга, который был разработан для линии клеток мышечной нейробластомы Neuro2a. Эта линия представляет собой модельную систему с гетерологической экспрессией генов рекомбинантных рецепторов. В данной работе метод кальциевого имиджинга был опробован для клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y человека, характеризующейся нативной экспрессией гомопентамерного ($\alpha 7$) и гетеропентамерных ($\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ и др.) нАХР. Вычисленные значения EC₅₀ агонистов никотина и PNU282987, а также IC₅₀ ингибитора аземиопина для $\alpha 7$ нАХР, нативно экспрессируемого в клетках линии SH-SY5Y, совпадали с соответствующими значениями, полученными для клеток Neuro2a. Тем же методом была подтверждена активность гетеромерных рецепторов клеточной линии SH-SY5Y, для чего построены кривые зависимости ответов клеток от концентрации специфических лигандов (цитизин, мекамиламин, α -конотоксин МП). Клеточная линия SH-SY5Y является хорошей модельной системой с нативной экспрессией нАХР, которая может использоваться в качестве этапа проверки лекарственных соединений, предшествующего исследованию их на животных.

5.3 ИНГИБИРОВАНИЕ МЫШЕЧНОГО НИКОТИНОВОГО АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА МАКАЛУВАМИНОМ G

Кудрявцев Д.С.¹, Спирина Е.Н.¹, Иванов И.А.¹, Шелухина И.В.¹, Уткина Н.К.², Кашиверов И.Е.¹, Стоник В.А.², Цетлин В.И.¹

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

²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Электронный адрес: kudryavtsev@ibch.ru

Мышечный никотиновый ацетилхолиновый рецептор (нАхР) играет ключевую роль в генерации потенциала концевой пластинки, крайне важного аспекта функционирования скелетной мускулатуры. Мутации в генах субъединиц мышечного нАхР способны приводить к различным дисфункциям опорно-двигательного аппарата, в частности к наследственным миастениям. Наследственные миастении "медленных каналов" (ММК) возникают в результате появления в субъединицах мышечного нАхР аминокислотных замен, приводящих к увеличению сродства рецептора к природным лигандам - ацетилхолину и холину, а также уменьшению скорости острой десенситизации рецептора. Подобные изменения нормального функционирования приводят к излишней активации рецептора и повреждению мышечного волокна. Изучение молекулярных механизмов работы мышечного нАхР под воздействием мутаций, ассоциированных с развитием ММК, способно продвинуть наше понимание аллостерических переходов в лиганд-управляемых ионных каналах, а также помочь в рациональном конструировании новых терапевтических агентов, воздействующих на данный тип рецептора. В рамках данной работы нами было изучено действие низкомолекулярного антагониста мышечного нАхР макалувамина G на формы рецептора, задействованные в развитии ММК. Выяснено, что макалувамин G ингибирует мышечный нАхР (K_i ~ 1,5 μ M) по бесконкурентному механизму, но не блокирует ионный канал. Комбинация свойств макалувамина G делает его перспективной молекулой для рационального конструирования терапевтических средств нового типа, а наличие нелинейных оптических свойств данной молекулы (гипер-рэлеевское рассеяние света) дает возможность применения новых методов детекции для изучения физиологических аспектов функционирования нАхР и других G_уs-петельных рецепторов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00627.

5.4 МЕТОДЫ КОМПЬЮТЕРНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ПЕПТИДНЫМИ ТОКСИНАМИ ИЗ ЯДА ПАУКА И ПОТЕНЦИАЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫМ ДОМЕНОМ КАЛИЕВОГО КАНАЛА KvAP

Петросян Н.С.^{1,2}, Чугунов А.О.¹, Парамонов А.С.¹, Арсеньев А.С.^{1,2}, Ефремов Р.Г.^{1,3}, Шенкарев З.О.^{1,2}

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

²Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

³Высшая школа экономики, Москва

Электронный адрес: gunnar.rus@gmail.com

Потенциал-зависимые калиевые каналы (Kv) играют важную роль в механизмах клеточного возбуждения и распространения нервного импульса. Токсин VSTx1 из яда паука *Grammostola spatulata* ингибирует инактивацию калиевого канала KvAP из археобактерии *Aeropyrum pernix* путем блокирования его потенциалочувствительного домена (ПЧД).

ЯМР исследование показало, что токсин связывается с поверхностью мицелл DPC/LDAO (2:1) с участием ярко выраженного гидрофобного участка. Однако, результаты молекулярной динамики (МД) с использованием мембран различного липидного состава (POPC/POPG 3:1 и POPC), а также компьютерное моделирование методом Монте-Карло в не явно заданной мембране указали на возможную гетерогенность взаимодействия пептид/мембрана.

Расчет взаимодействия между токсином VSTx1 и ПЧД-KvAP проводился с применением алгоритмов белок-белкового докинга и МД. После кластеризации траекторий МД и расчета белок-белкового докинга с алгоритмом ZDOCK было получено 20 000 возможных решений комплекса. Применение ограничений на основе данных ЯМР позволило сократить количество решений докинга до двух, из которых одно оказалось наиболее стабильным (RMSD=0.25±0.05). В полученном комплексе VSTx1 взаимодействует с трансмембранными спиралями S1 и S4 ПЧД-KvAP. При этом N-концевой участок молекулы токсина взаимодействует с петлей S1-S2 домена, тогда как C-концевой участок связывается с ПЧД в области спирали S4.

Суммируя полученные результаты, мы можем сделать вывод о возможном механизме действия VSTx1 на ПЧД канала KvAP. Токсин связывается с липидным бислоем и формирует комплекс с ПЧД в области петли S1-S2. После деполаризации мембраны и перехода ПЧД в *Up*-конформацию токсин VSTx1 связывает спираль S4, что блокирует ПЧД в деполаризованном состоянии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-14-10338.

СЕКЦИЯ 6 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ИММУНИТЕТА

6.1 РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ MICA В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Спелков А.А.¹, Абакушина Е.В.², Коваленко Е.И.¹, Кузьмина Е.Г.², Мушкарина Т.Ю.², Стрельцова М.А.¹, Каневский Л.М.¹

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

²Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба - филиал НМИРЦ Минздрава России, Обнинск

Электронный адрес: Alex_spelkov95@mail.ru

Под влиянием стрессовых факторов на поверхности здоровых клеток экспрессируется белок MICA, который является лигандом к рецептору NKG2D NK- и Т-клеток. Взаимодействие рецептора NKG2D клеток иммунной системы с MICA приводит к активации лимфоцитов и уничтожению носителя лиганда. MICA отличается высоким уровнем полиморфизма. К настоящему времени описано 87 аллелей, продукты которых различаются по способности активировать цитотоксические лимфоциты, что может оказывать влияние на протекание ряда заболеваний, таких как рак, вирусные инфекции, аутоиммунные заболевания. Данная работа посвящена анализу распределения аллелей MICA среди населения России. Типирование MICA проводили путем секвенирования ПЦР-фрагментов, полученных из ДНК, выделенной из цельной донорской крови по методике, предложенной в статье Yizhou Zou and Peter Stastny "High resolution MICA Genotyping by sequence-based typing (SBT)" *Methods in Molecular Biology*, vol. 882, 2012, p. 183-195. Анализ данных проводили с использованием программ Vector NTI и Chromas Lite. К настоящему моменту определен генотип аллелей MICA 69 доноров. Из 87 описанных в литературе аллелей MICA среди исследованных образцов обнаружены 14. Наиболее распространённым, как и в большинстве других стран, является аллель *008 (42,0%). Выявлены также аллели *002 (15,2%), *004 (6,3%), *007 (5,4%), *009:01/49 (4,5%), *010:01/69 (7,1%), *011 (2,7%), *012:01 и 03 (1,8%), *016 (2,7%), *018:01 (6,3%), *027/*048 (2,7%). Распределение аллелей MICA в России схоже с таковым для европейских стран. При сопоставлении данных литературы по разным странам мира выяснилось, что различия в распределении аллелей MICA выражены преимущественно между расами, а не нациями. Анализ распределения аллелей MICA в российской популяции может оказаться полезен для выявления предрасположенности индивидов к тем или иным заболеваниям.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 16-04-01867.

6.2 ИЗУЧЕНИЕ МАЛЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ АКТИВИРОВАННЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ИЗ КРОВИ ДОНОРОВ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ВИРУСА ЖЁЛТОЙ ЛИХОРАДКИ

Сычева А.Д., Погорелый М.В., Комеч Е.А., Звягин И.В., Мамедов И.З., Лебедев Ю.Б.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: ansycheva26@gmail.com

Специфический иммунный ответ всегда начинается с активации Т- или В-клеток, рецептор которых узнал антиген. Фенотип активированных клеток и строение их рецептора имеют большое значение для понимания особенностей ответа на тот или иной антиген и для дальнейшего практического применения в разработке вакцин и иммунотерапии.

В рамках проекта по вакцинации однояйцевых близнецов против жёлтой лихорадки в нашей лаборатории были выделены небольшие антиген-специфичные фракции Т-лимфоцитов в период активного иммунного ответа организма на вакцину. Для выявления активированных клеток были использованы два принципиально разных подхода. В первом варианте РВМС (Peripheral Blood Mononuclear Cell) донора были разделены на секретирующие или не секретирующие IFN γ фракции Т-клеток в ответ на стимуляцию вакциной. Разделение было проведено при помощи набора IFN- γ Secretion Assay (Miltenyi Biotec). Считается, что в условиях кратковременной стимуляции (5 часов) преимущественно активируются CD4⁺ Т-клетки, поэтому мы выполнили ещё один эксперимент с использованием метода проточной цитометрии и выделили фракции CD8⁺ Т-клеток, которые имели на поверхности мембраны маркёры активации: CD38 и человеческий лейкоцитарный антиген HLA-DR. На основе выделенной из полученных фракций Т-клеток РНК были приготовлены кДНК-библиотеки для секвенирования по технологии NGS (Next Generation Sequencing) на платформе Illumina.

По полученным данным были реконструированы нуклеотидные последовательности Т-клеточных рецепторов отобранных клонов и определены используемые в составе рецептора V-, J- и D-сегменты. По уникальным нуклеотидным последовательностям гиперварибельного участка рецептора активированные клоны были найдены в Т-клеточных репертуарах, полученных после секвенирования цельных и разделённых по фенотипу (CD4⁺, CD8⁺, клетки памяти) фракциях РВМС соответствующих доноров. Активированные клоны были охарактеризованы по фенотипическим свойствам и численности в полном репертуаре каждой временной точки, по данным о представленности клонов была построена динамика изменения численности со временем.

По результатам проточной цитометрии мы получили от 0,6 до 4% CD8⁺38⁺DR⁺ Т-клеток, а в реконструированных после секвенирования репертуарах доля активированных клонов Т-клеток составила от 0,2 до 1,7%. Также активированные клоны Т-клеток были найдены в группах Т-клонов, концентрация которых значительно изменилась в ходе вакцинации, у соответствующих доноров.

6.3 НОВЫЙ МЕТОД ДЕТЕКЦИИ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА ПОВЕРХНОСТИ ЕДИНИЧНОЙ КЛЕТКИ

Украинская В.М.¹, Степанов А.В.^{1,2}, Белогуров А.А.^{1,2}

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

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань
Электронный адрес: ukrainskaya49@gmail.com

Одной из важнейших мишеней современных фармакологических препаратов является система поверхностных клеточных рецепторов. Взаимодействие рецепторов с их лигандами и ко-рецепторами вовлечено в процессы передачи сигнала в клетку и является основополагающим в жизни любой клетки. Зачастую становится практически невозможным изучить взаимодействие рецептора и его лиганда и последующей передачи сигнала путем активации рецептора в силу методических ограничений воспроизведения условий подобных взаимодействий на поверхности клетки. В связи с этим разработка новых фармакологических препаратов, действие которых направлено на функционирование рецепторов и их акцепторных доменов, требует создания эффективных скрининговых систем, максимально воспроизводящих условия биологической активности исследуемого терапевтического агента.

Для решения данной задачи нами предлагается универсальная платформа, позволяющая изучать взаимодействия рецепторов и их лигандов в формате одной клетки непосредственно на поверхности клеточной мембраны. С этой целью был получен ряд генетических конструкций, основанных на принципе создания химерных рецепторов и активации репортерных Т-клеток. В данной работе нами была доказана применимость данной системы для анализа взаимодействия рецептора с растворимым лигандом, а также лигандом, заякоренным на поверхностной мембране клетки.

На примере взаимодействия варибельного домена анти-тус антитела в составе химерного рецептора и тус пептида, слитного с константным фрагментом иммуноглобулина, заякоренного на мембране клетки, нами было показано, что химерный рецептор взаимодействует с тус эпитопом, что приводит к активации Т-клеток. Путем добавления лиганда во внеклеточную среду была показана применимость метода для анализа взаимодействий трансмембранных заякоренных рецепторов с растворимыми лигандами.

Полученные доказательства эффективности работы предложенной платформы позволят осуществлять широкомасштабные скрининговые исследования фармакологических препаратов на мембранах клеток *ex vivo*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-24-00106.

6.4 ВЛИЯНИЕ HSP70 НА ПРОЦЕССЫ ГИБЕЛИ В ПОПУЛЯЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ В МОДЕЛИ ИНДУЦИРОВАННОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Федорина А.С., Троянова Н.И., Сапожников А.М., Шевченко М.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: fowlernchips@gmail.com

Нейтрофилы - клетки врожденной иммунной системы, являются медиаторами воспаления при проникновении экзогенных патогенов или повреждении тканей организма. Также приток нейтрофилов в ткани наблюдается на ранних стадиях аллергических реакций, однако с развитием аллергического воспаления нейтрофил-опосредованный ответ подавляется. В зависимости от типа клеточной гибели нейтрофилов воспаление может прогрессировать или разрешаться. Известно, что белок теплового шока 70 кДа (HSP70) обладает иммуномодулирующим действием при воспалении, но механизмы этого процесса до сих пор не изучены подробно.

Целью данной работы было изучить воздействие HSP70 на гибель нейтрофилов при развитии аллергической астмы.

Нейтрофилы выделяли из костного мозга мышей линии BALB/c методом негативной селекции при помощи магнитной сепарации. Чистоту популяции нейтрофилов Gr-1⁺F4/80⁻CD11b⁺ оценивали с помощью проточной цитометрии на приборе FACSCalibur. Клетки активировали форбол-12-мирикат-13-ацетатом (PMA) в диапазоне концентраций 0,005-50 мкМ, вместе с ним добавляли HSP70 или денатурированный белок в качестве контроля. Определение внеклеточных нуклеотидов проводили после инкубации клеток в течение 4 часов (37°C, 5% CO₂) с PMA в присутствии и без HSP70 по интенсивности флуоресценции SYTOX Green при помощи планшетного флуориметра GloMax-Multi Detection System. Уровень спонтанного апоптоза нейтрофилов определяли после инкубации клеток в течение 20 часов (37°C, 5% CO₂) при помощи набора Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit.

Показали, что уровень внеклеточных нуклеотидов в культуре PMA-активированных нейтрофилов достоверно снижался в присутствии HSP70. Также была продемонстрирована способность HSP70 дозозависимо усиливать спонтанный апоптоз нейтрофилов костного мозга после 20-часовой инкубации. При этом денатурированный HSP70 не обладал вышеперечисленными способностями. Таким образом, было показано, что в данной модели HSP70 способствует гибели нейтрофилов апоптозом и препятствует некрозу или нетозу, что приводит к разрешению воспаления.

6.5 КЛОНАЛЬНАЯ ДИНАМИКА ЭФФЕКТОРНОЙ СУБПОПУЛЯЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Фомченкова В.Е.¹, Комеч Е.А.¹, Сычева А.М.¹, Масчан М.А.², Звягин И.В.^{1,2}, Лебедев Ю.Б.¹

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

²Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева

Электронный адрес: taksa2708@mail.ru

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является стандартным методом терапии различных онкогематологических заболеваний с плохим прогнозом. В ходе ТГСК есть длительный период иммунодефицита, вызванный резким снижением числа и разнообразия клеток иммунной системы. Одним из способов защиты реципиента в этот период является инфузия зрелых Т-лимфоцитов донора в ходе периода восстановления после ТГСК.

В настоящей работе исследуется динамика восстановления эффекторной субпопуляции Т-лимфоцитов после трансплантации с помощью глубокого секвенирования β-цепей TCR (T-cell receptor, T-клеточный рецептор). Для этого была создана коллекция из 16 образцов клеток периферических Т-лимфоцитов двух пациентов с острым лимфобластным лейкозом после алогенной ТГСК с CD19/abTCR деплецией (для временных точек через 3 и 12 месяцев после ТГСК были отобраны две повторности тотального образца Т-лимфоцитов и по одному образцу фракций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток) и двух образцов фракции эффекторных Т-клеток от обоих доноров. Реконструкция репертуаров β-цепей TCR выполнена с помощью технологии подготовки библиотек кДНК TCR с молекулярным баркодированием, с последующим использованием программного обеспечения MiGEC для коррекции ошибок результатов секвенирования и количественной оценки глубины анализа библиотек, и MiTCR для реконструкции репертуаров, в результате чего были описаны закономерности восстановления иммунитета для двух пациентов.

Выяснили, что клональное разнообразие достигло до 490 тысяч клонов при 600 тысячах в аналогичной пробе здорового человека. Показано, что до 3% клонов, соответствующих инфузировавшимся Т-лимфоцитам донора, сохраняются в репертуарах пациентов в течение года после ТГСК и составляют от 0,3% до 11% от всех клонов репертуара пациентов. В целом фракция эффекторных Т-клеток донора составляла 3,8% от всех Т-лимфоцитов для первого и более 47% для второго пациента через год после инфузии.

В будущем планируется расширение выборки пациентов для этого исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-01881-а.

СЕКЦИЯ 7

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

7.1 СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЕ СТАРЕНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В КОНТЕКСТЕ mTOR СИГНАЛИНГА

Грюкова А.А., Бородкина А.В., Шатрова А.Н., Дерябин П.И., Бурова Е.Б.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Электронный адрес: grukova77@mail.ru

Ранее мы показали, что в ответ на сублетальный окислительный стресс эндометриальные стволовые клетки человека (эмСК) подвергаются преждевременному старению, которое сопровождается соответствующими фенотипическими изменениями клеток и необратимым арестом клеточного цикла (Vugova et al., Oxid Med Cell Longev, 2013). При изучении механизма стресс-индуцированного старения было обнаружено, что в H_2O_2 -обработанных клетках активируются p53/p21/Rb и p38 MAPK сигнальные каскады (Borodkina et al., Aging, 2014). На основании литературных данных мы предположили, что mTORC1 путь также может быть вовлечен в развитие преждевременного старения эмСК. С целью проверки этой гипотезы в настоящей работе был использован рапамицин, специфический ингибитор mTORC1. Рапамицин снижал активность SA- β -Gal и продукцию АФК в H_2O_2 -обработанных клетках, а также предотвращал увеличение их размера, что свидетельствует об участии mTORC1 сигнального пути в установлении фенотипа старения эмСК. В то же время рапамицин не восстанавливал пролиферацию стресс-индуцированных клеток. Эти данные согласуются с тем, что ингибирование mTORC1 не приводило к подавлению активности p53/p21/Rb сигнального пути, опосредующего блок клеточного цикла. Как известно, одним из регуляторов mTORC1 является AMP-киназа (АМПК). Учитывая, что АМПК способна подавлять активность mTORC1, усиление её активации при помощи метформина должно оказывать аналогичное рапамицину действие. В связи с этим была проведена серия экспериментов, направленных на сравнение эффектов рапамицина и метформина. Интересно, что метформин вызвал снижение фосфорилирования p53 и экспрессии p21 в H_2O_2 -стимулированных эмСК, однако не способствовал восстановлению их пролиферации. При этом, в отличие от рапамицина, метформин не оказывал влияния на фенотип H_2O_2 -обработанных эмСК и генерацию эндогенных АФК. Этот факт может быть связан с тем, что метформин приводил к снижению функционирования mTORC1 сигнального пути в гораздо меньшей степени, чем рапамицин. Таким образом, можно заключить, что mTORC1 сигнальный каскад непосредственно участвует в установлении фенотипа старения эмСК в условиях окислительного стресса, а АМПК при активации метформином оказывает слабое ингибирующее действие на функциональную активность этого пути.

7.2 СТРЕССОВОЕ ВЛИЯНИЕ СУБ-ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ДОЗ АНТИОКСИДАНТОВ НА ПРОЦЕСС САМООБНОВЛЕНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА

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

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

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

Электронный адрес: Kornienko.js@gmail.com

В настоящее время многие заболевания человека связывают с повышением внутриклеточного уровня активных форм кислорода (АФК). Считается, что окислительный стресс является причиной или важной составляющей сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, онкологических заболеваний, сахарного диабета и других. В связи с этим, активно изучается возможность применения антиоксидантов для предупреждения или терапии многих патологий человека. И, в то время как эксперименты на клеточных линиях, в которых были индуцированы какие-либо патологические состояния, показывают исключительно благотворный эффект от применения антиоксидантов, клинические испытания, в особенности высоких доз антиоксидантов, в большинстве своем либо не способствуют выздоровлению, либо напротив, ухудшают состояние больных. Научная общественность активно обсуждает причины этого явления, однако детальных научных исследований публикуется мало.

Настоящая работа направлена на изучение ответа мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека (МСКэ), полученных от здоровых доноров, на обработку суб-цитотоксическими дозами ряда антиоксидантов различного происхождения и различных механизмов действия. Под суб-цитотоксическими дозами антиоксидантов подразумеваются высокие дозы, существенно понижающие внутриклеточный уровень АФК, но не приводящие к гибели клеток. Наши эксперименты показали, что обработка стволовых клеток, поддерживающих физиологически-релевантный уровень АФК, высокими дозами антиоксидантов оказывает на клетки стрессовое воздействие. Были отмечены продолжительный блок клеточной пролиферации, сохраняющийся на протяжении всего времени анализа (более 48 часов), нарушение регуляции клеточного цикла, связанное с деградацией одного из важнейших белков-регуляторов пролиферативных фаз - циклина А, а также образование разрывов ДНК, маркированных фокусами фосфорилирования гистона H2AX, сопровождающееся активацией АТМ-киназы.

Мы предполагаем, что в случае использования высоких фармакологических доз, антиоксиданты, попадая в здоровые клетки организма, сдвигают их внутриклеточный редокс-баланс, что может приводить к нарушению многих метаболических и сигнальных путей, вызывая генотоксический стресс и блок пролиферации здоровых клеток организма человека, в том числе стволовых.

Работа поддержана грантом РНФ № 14-50-00068.

7.3 ФРАГМЕНТАЦИЯ МИТОХОНДРИЙ ДРОЖЖЕЙ

Овченкова А.П., Голева Т.Н., Рогов А.Г.

ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Москва
Электронный адрес: itself-a@yandex.com

До сих пор информация о морфологии митохондрий дрожжей и ее изменении исходила, главным образом, из исследований, выполненных на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, но пекарские дрожжи не являются идеальной моделью для такого рода исследований, поскольку они содержат малочисленные и слабоструктурированные митохондрии. Мы предлагаем новые, более перспективные модели для изучения морфологии митохондрий дрожжей. Это, прежде всего, дрожжи *Dipodascus (Endomyces) magnusii*, выделяющиеся среди всех исследованных дрожжей гигантскими размерами и имеющие в норме разветвленный митохондриальный ретикулум. Другой перспективной моделью являются дрожжи *Yarrowia lipolytica*, генетика которых известна и которые обладают диморфным ростом. При выращивании *Y. lipolytica* в специально подобранной среде удалось получить филаментозную форму *Y. lipolytica*, обладающую разветвленной сетью митохондрий. Третьей подходящей моделью оказались дрожжи аэробного типа обмена *Shizosaccharomyces pombe* с хорошо изученным геномом и хорошо структурированной митохондриальной сетью. Показано, что под действием окислительного стресса, индуцированного прооксидантом трет-бутилгидропероксидом (t-BHP), имела место фрагментация митохондрий во всех трех исследованных моделях, и она предотвращалась или даже обращалась митохондриально-направленными антиоксидантами.

Работа поддержана грантами РФФИ № 16-04-01040 и № 16-34-01272.

7.4 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК С НАТУРАЛЬНЫМ КИЛЛЕРАМИ

Полтавецев А.М.^{1,2}, Полтавцева Р.А.¹, Гречихина М.В.², Свирцевская Е.В.²

¹Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова, Минздрав России, Москва

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: andreypoltavtsev@gmail.com

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) считаются гипоиммуногенными. Показано, что МСК подавляют пролиферацию активированных лимфоцитов и блокируют активность натуральных киллеров (НК). В случае аутологичной трансплантации МСК могут оказывать терапевтический иммуносупрессорный эффект. Однако при гетерологичной пересадке МСК будут убиваться натуральными киллерами из-за различия в экспрессии молекул ГКГС I класса. Целью данной работы был анализ цитотоксической активности активированных и неактивированных митогеном лимфоцитов периферической крови (ЛПК) гетерологичного донора.

МСК получали из амниотической оболочки, покрывающей плодную часть послеродовой плаценты и Вартонова студня пупочного канатика человека. В работе также использовали клетки НЕК293. МСК рассеивали по планшетам в разной плотности и оставляли на ночь для достижения адгезии. ЛПК выделяли на градиенте плотности фиколла и активировали 20 мкг/мл фитогемагглютинина в течение ночи. ЛПК отмывали от митогена и вносили в культуры МСК в равном количестве, что давало соотношение ЛПК/МСК от 3 до 100. Через 24 ч совместного культивирования ЛПК собирали мягким пипетированием и подсчитывали их количество в камере Горяева. В культуры МСК добавляли МТТ и определяли их количество по формированию формазана. Анализ цитотоксичности проводили с использованием МСК или клеток НЕК-293, нагруженных красителем CytoxiLux TEL2, при соотношении ЛПК/мишень 30 методом проточной цитометрии.

Показано, что уже через 24 ч наблюдается дозо-зависимое снижение как количества МСК (на 20-60%), так и ЛПК (на 50-60%) в ко-культурах по сравнению с монокультурами МСК и ЛПК. Максимальное снижение количества МСК наблюдали в диапазоне соотношений 15-60; ЛПК - в диапазоне <50. Значительных различий между разными типами МСК не было. Анализ киллерной активности показал неспецифический киллинг мишеней как МСК, так и НЕК293, что показывает активацию НК. В культурах с неактивированными ЛПК снижение количества МСК было менее выражено (на 30%), но достоверно, а количество ЛПК почти не менялось. Таким образом, уже в первые 24 ч наблюдается активация НК и киллинг гетерологичных МСК.

Работа проведена при поддержке гранта РФФИ № 14-25-00179.

7.5 АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ТРАНСГЕННОГО ТЕТРАСПАНИНА CD63, СШИТОГО С ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫМИ БЕЛКАМИ, НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ЛИНИИ HeLa

Селенина А.В.^{1,2}, Куличкова В.А.², Томилин А.Н.², Цимоха А.С.²

¹Санкт-Петербургский государственный университет Санкт-Петербург

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Электронный адрес: nessa-5@yandex.ru

Экзосомами называют микроскопические внеклеточные везикулы (МВТ) диаметром 30-100 нм, выделяемые в межклеточное пространство различными клетками млекопитающих. Считается, что данные везикулы осуществляют особый способ коммуникации между клетками путем переноса и передачи различных белков и микроРНК от клетки к клетке. Механизмы секреции и поглощения данных везикул, однако, не совсем ясны, главным образом из-за сложности в точном определении данных везикул, так как они могут быть разных размеров и нести на себе различные маркеры. Чтобы решить эти вопросы, мы создали клеточную линию аденокарциномы рака шейки матки HeLa, стабильно экспрессирующую трансмембранный белок CD63, слитый с модифицированным красным флуоресцентным белком TagRFP на С-конце и зеленым флуоресцентным белком EGFP на N-конце молекулы. Белок CD63, также известный как Lamp3, относится к семейству тетраспанинов и преимущественно ассоциируется с МВТ/поздними эндосомами и мембранами экзосом. Флуоресцентные белки, сшитые с С- или N- концами белков интереса, позволяют наблюдать за локализацией и транспортом белков непосредственно в живых клетках, что исключает возможность формирования артефактов при фиксации клеток. Мы показали, что наличие флуоресцентного белка на С- или N- концах тетраспанина приводит к заметному снижению пролиферации и жизнеспособности клеток, что говорит о том, что целостность CD63 крайне необходима для нормальной жизни клеток. Несмотря на некоторую токсичность вводимого трансгена, мы смогли показать, что слитый с флуоресцентным белком CD63 покидает клетки именно в составе экзосом. Для получения экзозвезикул мы использовали фильтрацию и ультрацентрифугирование. Иммуноблот анализ подтвердил присутствие трансгенного CD63 в осажденной пробе экзозвезикул. Анализ траекторий наночастиц с помощью NanoSight NS300 определил размеры частиц в пробе экзозвезикул, которые соответствовали размерам экзосом. Причем при включении флуоресцентного канала в анализаторе NanoSight NS300, мы смогли определить размер экзозвезикул, несущих трансгенный белок CD63, сшитый с EGFP, что подтвердило возможность использования тетраспанина CD63, как маркера экзосом, для прижизненной визуализации экзосомального транспорта.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-04-01667-А и РФФИ № 16-14-10343.

7.6 НОВЫЙ МЕТОД АФФИННОЙ ОЧИСТКИ ЭКЗОСОМ НА ОСНОВЕ МЕМБРАННЫХ МАРКЕРОВ CD9 И CD63

Федоров И.А.^{1,2}, Цимоха А.С.²

¹Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, Санкт-Петербург

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Электронный адрес: ivan00fedorov@gmail.com

Экзосомы - везикулярные органеллы диаметром 40 - 100 нм, формируются внутри клетки в составе мультивезикулярных телц и затем выбрасываются во внеклеточное пространство. Экзосомы содержат в своем составе белки, ряд функциональных мРНК, миРНК, а также ДНК. Они рассматриваются как активные участники межклеточной коммуникации, задействованы в канцерогенезе и других патологических процессах. Особенный интерес для ученых в изучении морфологии и классификации этих везикул вызван возможностью их использования в качестве средства доставки терапевтических агентов. Перспективным представляется использование экзосом для терапии с помощью РНК-интерференции, иммунной или лекарственной терапии.

Краеугольным камнем в процессе изучения экзосом является способ их выделения. Распространенные методы, основанные на ступенчатом центрифугировании, не гарантируют отсутствие в выделенном объеме экзосом других экзозвезикул сходного размера. Решить эту проблему можно, применяя методы очистки, в которых используются маркеры экзосом. Мы разработали такой метод на основе мембранных маркеров экзосом CD9 и CD63, к которым присоединили биотин-связывающую последовательность для аффинной очистки. Трудность такого метода состоит в том, что эти белки содержат 4 трансмембранных домена, и оба конца их полипептидной цепи находятся внутри везикулы. Мы решили эту проблему, создав рекомбинантные белки, дополненные еще одним трансмембранным доменом, который выносит на поверхность везикулы полипептид для аффинной очистки. В составе полипептида находится сайт для расщепления TEV-протеазой и биотин-связывающая последовательность. Была получена клеточная линия на основе клеток человека HeLa, стабильно экспрессирующая рекомбинантные белки. Мы показали их экспрессию в составе везикул, провели очистку популяций экзосом, используя стрептавидин-агарозный носитель. Препарат экзосом был получен после отделения везикул от шариков TEV-протеазой. Успех процедуры выделения экзосом был подтвержден вестерн-блоттингом, а также, путем измерения размеров полученных везикул на NanoSight NS300. Разработанный нами метод позволит не только селективно очищать экзосомы от примесей других внеклеточных везикул, но и сравнивать между собой популяции экзосом, очищенные с использованием различных маркеров, что поможет в дальнейшей классификации этих везикул.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-01667.

7.7 ВЛИЯНИЕ СИМУЛИРОВАННОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ НА ПРОТЕОМ И МЕТАБОЛОМ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН РАПСА (*BRASSICA NAPUS*)

Чанцева В.В.¹, Дидио А.В.^{1,2}, Гришина Т.В.¹, Илинг К.³, Хохенвартер В.², Зинц А.³, Смоликова Г.Н.¹, Фролов А.А.², Медведев С.С.¹, Билова Т.Е.¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

²Лейбниц-Институт биохимии растений, Галле/Заале, Германия

³Институт фармации, Мартин-Лютер Университет Галле-Виттенберг, Галле/Заале, Германия

Электронный адрес: veronica.chantseva@gmail.com

Гравитация является ключевым фактором, определяющим полярный рост и развитие растений. Удобной моделью исследования молекулярных механизмов полярного роста являются условия микрогравитации на космических станциях. На Земле подобные эксперименты проводят в условиях симулированной микрогравитации, создаваемой клиностатированием. Несмотря на то, что представление об основных механизмах адаптации растений к микрогравитации к настоящему моменту в целом сформировано, информация об изменении протеома в отсутствие постоянного гравитационного вектора изучено недостаточно.

В этой связи, нами было изучено влияние симулированной микрогравитации на протеом прорастающих семян рапса. Также был проведен анализ метаболома как фактора, способного индуцировать неферментативные посттрансляционные модификации белков. Физиологическое состояние семян после их прорастания в условиях клиностатирования в течение 24 и 48 ч было охарактеризовано с помощью биохимических маркеров стресса. Протеом и метаболом семян были исследованы методами bottom up протеомики тандемной хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS) и газовой хромато-масс-спектрометрии (GC-MS), соответственно. Показано, что в условиях клиностатирования наиболее заметные изменения в паттерне метаболитов прорастающих семян происходили после 24 ч микрогравитационного воздействия. Одновременно было зарегистрировано развитие окислительного стресса, которое сопровождалось накоплением углеводов, аминокислот, органических кислот, а также окислительных модификаций белков и продуктов глубокого гликирования. Однако, в течение последующих 24 ч клиностатирования уровень многих перечисленных показателей возвращался к контрольным значениям. В целом, было обнаружено 217 и 73 белка, содержание которых возрастало и снижалось в условиях симулированной микрогравитации, соответственно. Поскольку большинство аннотированных полипептидов были вовлечены в белковый и липидный обмен, а также в процесс поддержания редокс гомеостаза, процессинг РНК и транскрипцию, то перечисленные метаболические процессы могут рассматриваться как наиболее чувствительные к условиям микрогравитации.

7.8 МОДУЛЯЦИЯ ИНДУКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Чуприянова Т.А.², Колегова А.С.², Попова А.А.¹, Хмель И.А.¹, Плюта В.А.¹

¹Институт молекулярной генетики РАН, Москва

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

Электронный адрес: tanya.chuprianova@gmail.com

В настоящее время большой интерес исследователей вызывает способность микроорганизмов синтезировать летучие органические соединения (ЛОС). Обнаружено более чем 1000 ЛОС, выделяемых микроорганизмами; структура многих из них не определена. Показано, что многие ЛОС подавляют рост микроорганизмов, в том числе, фитопатогенных, и модулируют рост растений. Механизмы действия ЛОС на клетки организмов в настоящее время мало известны.

В настоящей работе было исследовано действие ЛОС, образуемых в наибольшем количестве ризосферными штаммами родов *Pseudomonas* и *Serratia*, на ответ бактерий на окислительный стресс (ОС). Известно, что ответ бактериальных систем на ОС регулируется глобальными регуляторами транскрипции: белок OxyR контролирует транскрипцию группы генов, в состав которых входят *katG* (кодирует каталазу), *oxyS* (кодирует небольшую, регуляторную РНК), под контролем белков SoxRS находится индукция экспрессии генов, отвечающих на супероксидный стресс. Клетки бактерий защищаются от ОС, индуцируя синтез ряда ферментов, разлагающих активные формы кислорода. Исследовалось действие ЛОС (2-ундеканон, 2-нонанон, 2-гептанон и диметилдисульфид), на экспрессию генов *katG*, *soxS* и *oxyS*. В работе были использованы специфические lux-биосенсоры, отвечающие на экспрессию генов *katG*, *soxS*, *oxyS*. Сенсорами были клетки *E. coli* MG1655, несущие плазмиды с клонированными промоторами указанных генов и репортером lux-опероном. Было показано, что ЛОС не вызывают окислительный стресс. При предварительной обработке культуры биосенсора данными соединениями подавляется индукция окислительного стресса, вызываемая перекисью водорода или паракватом.

Также в работе было исследовано, могут ли ЛОС, синтезируемые бактериями, изменять чувствительность бактерий к антибиотикам. По литературным данным, некоторые антибиотики могут вызывать окислительный стресс у бактерий. Полученные результаты показывают, что в случае совместного действия гентамицина с 2-нонанонем и гентамицина с диметилдисульфидом наблюдается повышение устойчивости клеток *E. coli* K12S str-g к действию антибиотика.

7.9 ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОМА *ARABIDOPSIS THALIANA* В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

Шумилина Ю.С.¹, Паудель Г.², Бергер Р.², Балке Г.У.², Биркемайер К.³,
Вессёхонн Л.А.³, Фролов А.А.², Гришина Т.В.¹, Билова Т.Е.¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

²Лейбниц-Институт биохимии растений, Галле/Зале, Германия

³Университет Лейпцига, Лейпциг, Германия

Электронный адрес: schumilina.u@yandex.ru

Засуха это важный фактор абиотического стресса, действующий на растения и являющийся одной из главных причин снижения урожайности. В качестве адаптации к действию засухи в тканях растений накапливаются осмопротекторы - аминокислоты и углеводы. В тоже время, окислительный стресс, индуцированный дегидратацией тканей, может вызывать усиление аутоокисления накопленных углеводов. Этот процесс сопровождается развитием карбонильного стресса, т.е. усиленной генерацией α -дикарбониллов - реактивных метаболитов, способных вызвать накопление продуктов глубокого гликирования белков (КППГ), которые являются потенциальными факторами повреждения белка. В настоящее время процесс гликирования у растений активно изучается, тем не менее, спектр КППГ, молекулярные механизмы их формирования и деградации изучены не полностью. В связи с этим, в настоящей работе было исследовано влияние начальных этапов дегидратации тканей растений, связанной с развитием засухи, на интенсивность и паттерн гликирования белка. Для этого была разработана модель осмотического стресса, основанная на насыщении агара полиэтиленгликолем, моделирующая условия слабо-выраженной засухи и применимая к взрослым растениям *Arabidopsis thaliana*. Также были исследованы метаболом и протеом растений методами газовой (GC-MS) и тандемной хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Показано, что состояние стресса у растений развивалось на третий день воздействия пониженного водного потенциала, о чем свидетельствовало повышение в тканях уровня содержания абсцизовой кислоты и продуктов перекисного окисления липидов. В это время также накапливались метаболиты, свидетельствующие об активации адаптационных процессов: аминокислоты (пролин, валин), моно- и олигосахариды. Условия слабой засухи вызвали существенные количественные и качественные изменения в протеоме растений. Многие из стресс-специфичных белков или белков, содержание которых возрастало в ответ на стресс, были вовлечены в адаптивные реакции растений, например, предотвращали денатурацию белков, сохраняли структуру мембран (HSP70, дегидрины, LEA-белки), поддерживали рН (АТФ-аза a_3) и редокс гомеостаз клеток (аскорбатпероксидаза), а также антигликирующую защиту клеток (глиоксалаза 1). Несмотря на высокий адаптивный потенциал, в условиях слабой засухи у растений происходило значительное гликирование протеома. За три дня воздействия было обнаружено 43 белка с КППГ модификациями. Интересно, что наиболее подверженные гликированию оказались белки, вовлеченные в регуляцию транскрипции.

СЕКЦИЯ 8

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ

8.1 ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ АЛЬБУМИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ СИСТЕМЫ ФЕНТОНА

Акинфиев В.С., Горобец М.Г., Бычкова А.В., Мисин В.М.

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

Электронный адрес: doommer@mail.ru

Альбумин является давно известным и, вероятно, одним из наиболее изученных белков. В организме человека он выполняет различные функции, в том числе поддержание осмотического давления крови, транспорт жиров и низкомолекулярных соединений, восстановление активных форм кислорода [1]. Подобно многим другим белкам, альбумины могут подвергаться окислительной модификации под действием активных форм кислорода, вызывающих нарушение его структуры, что позволяет формировать ковалентно сшитые образования на различных поверхностях [2].

Целью данной работы было выявление закономерностей образования нерастворимых форм альбумина при различных условиях свободнорадикального окисления под действием системы Фентона.

В работе были использованы человеческий и бычий сывороточные альбумины, окисленные при различных концентрациях пероксида водорода и железа (II). Для анализа модификаций были использованы следующие методы: динамическое светорассеяние, спектрофотометрия и органолептический анализ.

Наиболее активно подвергается окислению -SH группа несвязанного Cys34 остатка, сначала окисляясь до дисульфидной -S-S- связи, а затем до сульфоновой -SO₃H группы [3]. Было показано различие в структуре образующегося осадка при разной степени окисления. При изучении взаимодействия ионов железа с альбумином доказано, что двухвалентное железо практически не влияет на гидродинамический радиус молекул, в то время как ионы трёхвалентного железа при значительных концентрациях провоцируют агрегацию альбумина.

Проведены исследования поведения сшитых белковых покрытий на наночастицах в кислых средах, направленные на оценку устойчивости формируемых покрытий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60244 мол_а_дк.

Литература

1. Theodore Peters Jr., All About Albumin, Biochemistry, Genetics, and Medical Applications-Academic Press (1995)
2. Патент РФ на изобретение № 2484178 от 10.06.2013. Заявка на Патент РФ № 2011136972, приоритет от 08.09.2011. Розенфельд М.А., Бычкова А.В., Сорокина О.Н., Коварский А.Л., Леонова В.Б., Ломакин С.М., Макаров Г.Г. Способ получения белковых покрытий на поверхности твердых тел, содержащих ионы металлов переменной валентности.
3. Karl Oetl and Gunther Marsche, Methods in Enzymology, Volume 474, P. 181-195. (2010)

8.2 СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕДПОСАДОЧНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ОГУРЦА (*CUCUMIS SATIVUS* L.) РЕГУЛЯТОРАМИ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

Беленко Д.П.

Калининградский государственный технический университет, Калининград
Электронный адрес: belenkospiker@mail.ru

Изучено действие следующих биологически активных веществ - природных соединений и их синтетических аналогов - Эпин-Экстра (действующее вещество (д.в.) 24-эпибрассинолид), Иммуноцитифит (д.в. этиловый эфир арахидоновой кислоты) и Циркон (д.в. гидроксикоричные кислоты) на посевные качества семян огурца (*Cucumis sativus* L.). Показано, что даже в низких концентрациях ($1,25 \cdot 10^{-5}$ - $3,5 \cdot 10^{-3}$ г/л д.в.) все препараты оказывали положительное действие на энергию прорастания и всхожесть семян, сниженные за время хранения на 15 и 35%, соответственно. Однако величина оказываемых эффектов была различной. Наибольшей эффективностью обладал препарат Эпин-Экстра, повысивший энергию прорастания и всхожесть семян практически до исходных значений, наименьшей - Иммуноцитифит - при его использовании изученные показатели увеличились лишь на 10-15%.

Сделан вывод о том, что все изученные препараты в той или иной степени способны стимулировать биологические процессы на начальных этапах прорастания семени. Обсуждаются молекулярные механизмы стимулирующего действия биологически активных веществ на внутриклеточные процессы, протекающие в семенах.

Полученные результаты дают основание для включения биотехнологического приема предпосадочной обработки семян биологически активными веществами в технологию выращивания огурцов.

8.3 СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ПРОДУЦЕНТА Фолликулостимулирующего Гормона ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТЕХНОЛОГИИ *Crispr/Cas9*

Болотова А.А., Воробьева И.Г., Павленко Д.М., Корягина Т.Б., Степаненко В.Н.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: iva1647@yandex.ru

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) вместе с другим гонадотропным гормоном - лютеинизирующим гормоном (ЛГ), вырабатывается передней долей гипофиза, чтобы регулировать важные функции яичников (производство и созревание фолликулов) и семенников (сперматогенез). Сегодня, процедуры с применением рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (гФСГ) являются опорой в различных областях репродуктивной медицины. В настоящее время гетеродимер и гликопротеин - рекомбинантный ФСГ производится в клеточных линиях высших эукариот, поддерживающих правильный фолдинг и гликозилирование. Клетки яичника китайского хомячка (СНО) - распространенная модель для производства рекомбинантных терапевтических белков со сложными гликоформами. Традиционно создание рекомбинантных гСНО клеточных линий основывается на векторах для случайной интеграции гена интереса в геном с последующим отбором клеток, несущих трансген. Для того чтобы обойти неуправляемое внедрение трансгенов в клеточных линиях гСНО, применяются различные подходы для сайт-направленной интеграции. Выбор в пользу технологии с использованием нуклеаз, таких как "цинковые пальцы" (ZFNs), TALENS и CRISPR/Cas9 делают, чтобы создать целевую вставку/удаление последовательности ДНК при помощи гомологичной направленной рекомбинации в широком диапазоне организмов и типов клеток.

В данной работе для интеграции SgRNA Mgat1 локуса его последовательность клонирована под U6 промотор, полученная конструкция клонирована рядом с геном Cas9, затем кассета размещена на челночном векторе с последующей вставкой кассеты содержащей субъединицы целевого гена. На следующем этапе работы проведен ряд целевых транзиторных трансфекций штамма СНО-s с различными вариантами созданных конструкций. Продуктивность трансфицированного пула на 2-й и 6-й день трансфекции методом ИФА анализа подтвердила эффективность последней. Затем с оптимальным сочетанием конструкций проведена целевая трансфекция, при которой отобраны клоны, резистентные к высокому уровню метатрексата и обеспечивающие высокую продуктивность фолликулостимулирующего гормона человека.

8.4 СИНТЕЗ КОНЬЮГАТА АНТИТЕЛО-ОЛИГОНУКЛЕОТИД ПРИ ПОМОЩИ БИООРТОГОНАЛЬНОЙ КЛИК-РЕАКЦИИ

Воронина Д.В., Рязанцев Д.Ю.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: daryavoronin2009@yandex.ru

В последние 10 лет стремительно развивается концепция "клик-химии", а также ведется поиск новых биоортогональных реакций с целью получить возможность проведения модификации биологических субстратов, строго специфично и не нарушая их функциональную активность. На данный момент широко распространенными реакциями, удовлетворяющими этим требованиям, являются реакция азид-алкинового циклоприсоединения, реакция [4+2]-циклоприсоединения диенофилов и сопряженных диенов (реакция Дильса-Альдера), лигирование по Штаудингеру и др. Одной из перспективных областей применения биоортогональных реакций представляется конъюгирование молекул антитела (АТ) и ДНК-метки для последующего их использования в качестве детектирующей системы в иммуно-ПЦР.

Для получения конъюгата АТ и одноцепочечного олигонуклеотида размером 60 н. (ОН) в работе использовалась реакция азид-алкинового циклоприсоединения, промотируемого напряжением. В качестве модифицирующего агента для АТ был выбран сульфоторфениловый эфир азидокапроновой кислоты; ОН модифицировали N-гидроксисукцинимидным эфиром дибензоциклоактина. Условия реакции (оптимальное время, соотношение АТ:модифицирующий агент) оптимизированы на модельных АТ: ВЕ5 против IgE человека, МА2 против IgM и АТ к токсину тканевого шока стафилококка. Выделение конъюгата проводили в несколько этапов: ионообменной хроматографией на колонке TSK-DEAE5PW и методом гель-фильтрации на колонке Superose 6 10/300 GL с дальнейшей очисткой полученных фракций на TSKgel® G3000SWXL. Результаты анализировали методами электрофореза белков и олигонуклеотидов в ПААГ. При соотношении АТ:модифицирующий агент 1:3 конъюгат детектировался как несколько полос с молекулярными массами более 180 кДа.

Таким образом, на основе реакции азид-алкинового циклоприсоединения были получены конъюгаты АТ и ОН.

В дальнейшем планируется тестирование и применение конъюгатов в иммуно-ПЦР для детекции IgE и IgM в сыворотке крови человека.

Исследование выполнено за счет гранта РФ (проект № 16 14-00136) и стипендии Президента РФ СП-4413.2015.4.

8.5 МОДУЛИРУЕМЫЕ АКЦЕПТОРЫ ИНДУКТИВНО-РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ НА ОСНОВЕ ЛИПОКАЛИНА B1c И СИНТЕТИЧЕСКИХ ХРОМОФОРОВ

Гавриков А.С., Лукьянов К.А., Мишин А.С.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва.
Электронный адрес: gavrikovalexey1@gmail.com

Индуктивно-резонансный перенос энергии между флуорофорами широко применяется в исследовании белок-белковых взаимодействий и биохимических процессов *in vivo*. Данная работа посвящена разработке модулируемых акцепторов переноса энергии на основе белков, связывающих синтетические хромофоров. Обратимое взаимодействие хромофора с лиганд-связывающим "карманом" белка позволит многократно измерять опытную и контрольную точки путем добавления или отмывки хромофора.

В качестве модельной системы был создан ряд модельных индикаторов активности каспазы-3, состоящих из флуоресцентных белков (доноры) и мутантов липокалина B1c, связывающими синтетические хромофоров (акцепторы). Каспаза-3 расщепляет линкер между донором и акцептором, который содержит специфическую последовательность аминокислот. Эффективность переноса определяли по изменению флуоресценции донора при добавлении хромофоров и каспазы-3. В результате была определена комбинация донор-акцептор с наибольшей эффективностью переноса энергии (60% для пары NeonGreen:B1c-A27C/L132N). Эффективность данной донорно-акцепторной пары в составе белка слияния с гистоном H2B была также определена в условиях широкопольной флуоресцентной микроскопии на модели культуры клеток млекопитающих (линии НЕК293Т).

Мы полагаем, что системы индуктивно-резонансной передачи энергии с подобным "управляемым" акцептором качественно превосходят традиционные пары на основе флуоресцентных белков. Динамический контроль акцептора, достигаемый добавлением или отмывкой хромофора, позволит более точно определять эффективность переноса энергии.

8.6 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТА ЛЕНТИНАНА *LENTINUS EDODES* Led-10/MU НА МАТРИЦЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Гаврюшина И.А., Губайдуллин А.В., Кудрякова Г.Х.

Первый московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова, Москва
Электронный адрес: irina-alekscandrovna2013@yandex.ru

Бактериальная целлюлоза - нетоксичный и биосовместимый биополимер, который рекомендуют использовать не только в регенеративной медицине, но и для иммобилизации клеток труднокультивируемых продуцентов. Представитель лекарственных базидиомицетов *Lentinus edodes* является продуцентом биологически активного соединения лентинана. Полученный материал может представлять большой интерес как иммобилизованная система получения лентинана для фармацевтического производства новых лекарственных препаратов.

В связи с этим, целью работы было подобрать условия для иммобилизации базидиомицета *Lentinus edodes* Led-10/MU на матрице бактериальной целлюлозы, синтезируемой *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547) (Громовых и др., 2010). Для получения мицелия *Lentinus edodes* проводили модификацию питательной синтетической среды Н-5 (Фан Ми Хань и др., 2012), изменив концентрации некоторых компонентов. Жидкофазное стационарное культивирование продуцента проводили отдельно и совместно со штаммом-продуцентом бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008. Долю иммобилизованного мицелия при совместном культивировании определяли по количественному содержанию белка методом Брэдфорд (Bradford, 1976; Bailey, 2009).

Исследования показали, что продуцент *Lentinus edodes* образует мицелий на модифицированной синтетической среде Н-5 как в чистой культуре, так и при совместном стационарном культивировании на матрице бактериальной целлюлозы. Содержание белка в иммобилизованном мицелии на матрице бактериальной целлюлозы оказалось низким 3,84%, чем в чистой культуре 8,76%. Таким образом, при совместном культивировании доля иммобилизованного мицелия составила 43,83%, а доля целлюлозы - 56,17%.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности культивирования лекарственного базидиомицета *Lentinus edodes* на матрице бактериальной целлюлозы как продуцента биологически активного соединения лентинана.

8.7 УСЛОВИЯ ОБРАЗОВАНИЯ ДИМЕРОВ ПРАЙМЕРОВ В ПЦР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРАЙМЕРОВ "ВСТЫК"

Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р.

Институт биохимии и генетики Уфимского НЦ РАН, Уфа
Электронный адрес: aiz.galimova@yandex.ru

Аmplификация ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) является одним из широко используемых подходов при решении экспериментальных задач молекулярной биологии, генетики, судмедэкспертизы и т.д. При постановке амплификации часто возникает проблема образования неспецифических продуктов. Часто в случае неудачного подбора праймеров образуются так называемые димеры праймеров, представляющие собой двуцепочечную ДНК с длиной, близкой к сумме длин двух праймеров. В результате залипания праймеров друг на друга формируется нежелательная ДНК-матрица, конкурирующая с целевой мишенью, которая амплифицируется намного эффективнее в силу небольшой длины.

Ранее нами была подробно изучена ПЦР-амплификация с помощью праймеров "встык" [1]. Продукты ПЦР-амплификации с праймерами "встык" равны сумме длин праймеров. Однако в случае некачественного подбора таких праймеров высока вероятность образования димеров, которые имеют примерно близкие размеры и, соответственно, на электрофореграмме будут иметь подвижность, близкую к таковой для целевых ампликонов. В данной работе нами изучены различные аспекты образования димеров праймерами "встык". Были подобраны 4 пары праймеров "встык": без залипания 3'-нуклеотидов, залипающие одним, двумя, тремя нуклеотидами. К ним были синтезированы одноцепочечные матрицы М0, М1, М2, М3, на которых соответствующие праймеры отжигаются "встык", и матрица М100, на которой все праймеры максимально удалены. Для праймеров без залипания 3'-концевых нуклеотидов и залипающих одним нуклеотидом показано отсутствие наработки продуктов димеризации даже при продолжительной амплификации (до 40 циклов). Для пары праймеров, залипающих двумя 3'-концевыми нуклеотидами, продукты димеризации появляются уже к 35 циклу реакции. Электрофореграмма результатов амплификации для пары праймеров, залипающих тремя 3'-концевыми нуклеотидами, показала невозможность выявления коротких целевых продуктов реакции в силу образования димеров праймеров уже на ранних циклах амплификации. Таким образом, при подборе праймеров "встык" недопустима комплементарность праймеров даже на два 3'-концевых нуклеотида.

Литература

1. Гарафутдинов Р.Р., Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Вахитов В.А., Чемерис А.В. ПЦР-амплификация ДНК с помощью праймеров "встык" // Молекулярная биология, 2015, т. 49, № 4, с. 628-637.

8.8 ЗЕЛЕННЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ С БОЛЬШИМ ВРЕМЕНЕМ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Горбачев Д.А., Саркисян К.С., Мишин А.С., Лукьянов К.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: igorbachev@icloud.com

Получение флуоресцентных белков с высоким временем жизни флуоресценции является важной задачей для развития методов на основе времязрешенной флуоресцентной микроскопии (FLIM) и Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET). Время жизни флуоресценции большинства зеленых флуоресцентных белков находится в диапазоне 1.5 - 3 нс. Исключение составляет недавно полученный в нашем коллективе белок NowGFP с анионным хромофором на основе триптофана, характеризующийся временем жизни около 5 нс. Модельные FRET-пары на основе NowGFP обладают наибольшим Ферстеровским радиусом среди всех опубликованных FRET-пар на основе флуоресцентных белков. Однако, NowGFP обладает низкой фотостабильностью из-за эффективной фотоконверсии, сопровождающейся декомпозицией боковой цепи лизина 61 и переходом хромофора в нейтральное состояние.

В данной работе в качестве основы для мутагенеза мы использовали голубой флуоресцентный белок mTurquoise2, характеризующийся очень высоким квантовым выходом флуоресценции (0.93) и высоким временем жизни флуоресценции (4 нс). Для сдвига спектров флуоресценции в зеленую область была введена замена T203Y, которая приводит к батохромному сдвигу за счет стекинга тирозина 203 с хромофором, а не за счет депротонирования последнего. Последующий случайный мутагенез позволил получить улучшенные варианты с временем жизни флуоресценции до 4.8 нс и достаточно высокой фотостабильностью, сопоставимой с таковой белка EGFP. Мы считаем, что полученные флуоресцентные белки могут быть потенциально использованы для многопараметрической FLIM микроскопии в зеленом канале детекции (совместно с другими зелеными флуоресцентными белками с меньшим временем жизни), а также в качестве FRET-доноров для оранжевых и красных флуоресцентных белков для детекции белок-белковых взаимодействий и создания FRET-сенсоров.

8.9 ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМНЫХ ФОРМ ФЛАВОЛИГНАНОВ СИЛИМАРИНА, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ХОЛЕСТЕРОЛОМ

Гудкова О.И., Кенда А.М., Ходжаева Р.Н., Мучкина Е.А., Кудрякова Г.Х., Фельдман Н.Б.

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, Москва
Электронный адрес: martakg@mail.ru

Одной из важнейших задач современной медицинской биотехнологии является повышение биодоступности и эффективности терапевтического действия биологически активных веществ, получаемых из лекарственных растений.

Силимарин из расторопши пятнистой представляет собой комплекс флаволигнанов, обладающий высоким потенциалом антиоксидантного, мембраностабилизирующего, противовоспалительного и гепатопротекторного действия. При этом терапевтический потенциал силимарина не проявляется в полном объеме из-за его низкой растворимости в биологических жидкостях и, вследствие этого, недостаточно высокой биодоступности. Одним из путей повышения растворимости и увеличения эффективности действия силимарина является применение в его в липосомной форме.

Целью настоящей работы являлось создание водорастворимой формы силимарина с помощью липосомной технологии.

Для получения липосомной формы силимарина применяли метод инъекции с последующей ультразвуковой обработкой дисперсии оволецитин-холестерол-силимарин. Размеры липосомных частиц, определенные с помощью метода электронной микроскопии, находились в диапазоне от 230 до 370 нм. Средний размер полученных липосомных частиц, определенный с помощью метода лазерной корреляционной спектроскопии, составлял 293 ± 54 нм. Концентрации липидов и силимарина в полученной дисперсии составляли 30 мг/мл и 8 мг/мл, соответственно. Степень включения силимарина в липосомы составляла 23-29%. Полученный липосомный препарат стабилен в водных растворах и устойчив к высушиванию путем лиофилизации.

8.10 ПОИСК НОВЫХ ПОДХОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КЛЕТОК ШТАММА *RHODOCOCCLUS OPACUS* 1CP

Егозарьян Н.С.^{1,2}, Поливцева В.Н.¹, Емельянова Е.В.¹, Сузина Н.Е.¹,
Соляникова И.П.¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
РАН, Пущино

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва.
Электронный адрес: natae05@yandex.ru

Одной из важнейших проблем микробиологии является выживание видов неспорообразующих бактерий в природе в условиях дефицита необходимых для роста и развития доступных источников углерода, азота и фосфора, а также видоспецифических факторов роста. Микроорганизмы в естественной среде, как правило, находятся под воздействием неблагоприятных факторов (колебания температуры, pH, присутствие агрессивных соединений антропогенного происхождения и т.д.). Исследования жизнеспособности и метаболической активности бактерий в стрессовых условиях, а также их биодеградативного потенциала сегодня приобретают актуальный характер не только в отношении понимания основ жизнедеятельности микроорганизмов, но и в прикладных аспектах использования штаммов.

Цель работы - поиск новых подходов получения жизнеспособных цистоподобных клеток и оптимизация методов их получения.

Исследования проводили на модельном штамме актинобактерий *Rhodococcus opacus* 1CP. В качестве основного подхода использовали приём длительного хранения вегетативных клеток штамма на различных питательных средах. Предполагалось, что некоторые из этих соединений могут спровоцировать быстрый переход клеток в цисто-подобное покоящееся состояние (ЦПС).

В результате исследования были обнаружены условия, позволяющие получить популяцию с высоким (до 90%) содержанием покоящихся жизнеспособных клеток. Хранение культуры покоящихся клеток (ПК) в течение 6-9 мес. не сказывалось на её способности к возобновлению роста. Культивирование ПК в минеральной среде с бензоатом (300 мг/л), фенолом (100 мг/л), 4 хлорфенолом и 2,4,6 трихлорфенолом (50 мг/л) приводило к убыли субстрата за 2 суток. Методом RT-PCR была показана индукция ферментов, отвечающих за разложение токсикантов. Дана характеристика субстратной специфичности моно- и диоксигеназ, катализирующих ключевые этапы деструкции этих соединений.

Прямая иммобилизация ПК штамма *R. opacus* 1CP позволила получить прорастающую активную в отношении фенола форму бактерий. Проведены исследования для оптимизации процессов биодеградации токсичных соединений, разработаны методы длительного хранения клеток с сохранением их жизнеспособности для создания биопрепаратов.

Работа поддержана РНФ, грант № 14-14-00368.

8.11 ПОИСК НОВЫХ АНТИБИОПЛЕНОЧНЫХ АГЕНТОВ: НИКЛОЗАМИД

Журина М.В., Тетенева А.Н., Ганнесен А.В., Мартьянов С.В.,
Плакунов В.К.

ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” (Институт микробиологии
им. С.Н. Виноградского РАН, Москва)

Электронный адрес: mzhurik@mail.ru

Биопленки являются преимущественной формой существования микроорганизмов в природе (Николаев, Плакунов, 2007). В составе биопленки бактерии обладают значительной устойчивостью к воздействию неблагоприятных физико-химических факторов среды, а также антибиотиков. В настоящее время ведется поиск недорогих, но эффективных соединений для борьбы с микробными биопленками. К сожалению, большинство описанных до сих пор антибиопленочных агентов являются токсичными не только для биопленок, но и для организма человека. Поэтому мы используем другой подход - поиск веществ с антибиопленочной активностью среди лекарственных средств и пищевых добавок, уже прошедших клинические исследования и доказавших свою безопасность (Мартьянов и соавт., 2015). Одним из них является никлозамид - противогельминтный и моллюскицидный препарат, способный подавлять рост бактерий. Нами исследована антибиопленочная активность никлозамида против ряда грамположительных бактерий, занимающих разные экологические ниши: бактерии, выделенные из пластовых вод нефтяных месторождений (*Kocuria rhizophila*, *Dietzia natronolimnaea*) и симбионты кожи человека (*Staphylococcus aureus* и другие). В наших экспериментах никлозамид подавлял биопленки этих бактерий. Штаммы-комменсалы человека имеют близкие ID₅₀ (концентрация ингибитора, подавляющая рост на 50% по сравнению с контролем) - от 0,05 до 0,08 мкг/мл. Один из штаммов - *D. natronolimnaea* - показал высокую чувствительность к никлозамиду (ID₅₀ 0,17 мкг/мл). Обнаружен аддитивный эффект никлозамида и азитромицина против биопленок *K. rhizophila* и *S. aureus*. Другой организм, *K. rhizophila*, напротив, менее чувствителен к этому препарату. Таким образом, мы показали эффективность никлозамида как антибиопленочного препарата широкого спектра действия, активного против представителей разных экотопов.

Литература

1. Николаев Ю.А. Плакунов В. К. Биопленка - "город микробов" или аналог многоклеточного организма // Микробиология, Т. 76 № 2-2007.
2. Мартьянов С.В., Журина М.В., Эль-Регистан Г.И., Плакунов В.К. Активирующее действие азитромицина на формирование бактериальных биопленок и борьба с этим явлением // Микробиология. 2015. Т.84. № 1. С. 27-36.

8.12 РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕССИОННЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ТКАНЕВОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ ЯИЧНИКА КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА

Ильин И.С., Орлова Н.А., Воробьев И.И., Ковнир С.В., Ходак Ю.А.

ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” (Институт биоинженерии РАН, Москва)

Электронный адрес: ivan-06.1993@yandex.ru

Тканевой активатор плазминогена (ТАП) – сериновая протеаза, катализирующая превращение плазминогена в плазмин и последующий запуск системы лизиса фибринового тромба в кровотоке. Рекомбинантный ТАП человека, получаемый в культивируемых клетках яичника китайского хомячка СНО, применяется в медицине в качестве эффективного тромболитического агента, в основном при инфаркте миокарда. В отличие от тромболитических ферментов бактерий (стрептокиназа) ТАП не проявляет иммуногенности, действует избирательно, преимущественно на поверхности тромба. Одно из направлений создания эффективного продуцента рекомбинантного белка является усовершенствование векторов для гетерологической экспрессии. При этом достигаются повышение уровня экспрессии трансгена и снижение гибели клеток, оптимизация синтеза белка за счет замены кодонов на более распространённые для выбранного продуцента. Целью настоящей работы являлось получение синтетической оптимизированной ОРС гена ТАП, разработка оптимального вектора для получения эффективного продуцента ТАП.

Было установлено, что для экспрессионных векторов семейства p1.1, основанных на длинных некодирующих участках гена фактора элонгации трансляции 1а китайского хомячка и фрагменте длинных концевых повторов вируса Эпштейна-Барр, уровень секреции ТАП в пересчете на одну геномную копию целевого гена выше при увеличении длины предтрансляционного участка целевого гена совместно с использованием природной последовательности Козак данного гена. Замена природной открытой рамки считывания ТАП на синтетическую оптимизированную и проведение ко-трансфекции парой плазмид с маркерами устойчивости DHFR и GS также позволяет получить высокую скорость секреции ТАП.

Таким образом, использование синтетической ОРС гена ТАП, оптимизированной для экспрессии в клетках СНО, предтрансляционного участка гена ТАП и ко-трансфекции позволяют получить эффективный продуцент ТАП.

8.13 НАНОРАЗМЕРНЫЕ КАПСУЛЫ НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ ИНКАПСУЛИРОВАННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Иноземцева О.А.¹, Иматдинов А.Р.², Балышева В.И.², Марквичева Е.А.³

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

²ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии, пос. Вольгинский, Владимирская обл.

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

Электронный адрес: inozemtsevaoa@mail.ru

Капсулы на основе диоксида кремния привлекательны в качестве средств доставки благодаря их химической инертности, биосовместимости, биоразлагаемости, а также возможности биофункционализации поверхности [1,2]. В качестве темплатов для формирования оболочек на основе диоксида кремния были использованы пористые частицы карбоната кальция (ватерит), которые могут быть эффективно загружены биологически активными веществами [3], а покрытие диоксидом кремния позволяет обеспечить долгосрочное сохранение биоэффективности инкапсулированного материала. Были разработаны оптимальные условия формирования наноразмерных капсул (500-800 нм) на основе диоксида кремния на субмикронных темплатах карбоната кальция, содержащих инкапсулированные биологические активные молекулы (ДНК-плазмиды, TRITC-маркированный бычий сывороточный альбумин). Для характеристики структурных и поверхностных свойств полученных композитных материалов были использованы методы электронной и флуоресцентной сканирующей микроскопии. Инкапсулирование низкомолекулярных веществ и макромолекул, в частности белков и ДНК, в субмикронные капсулы на основе диоксида кремния представляется перспективным, так как открывает возможности для создания инкапсулированных лекарств, в частности противоопухолевых препаратов, а также ДНК вакцин с пролонгированным/контролируемым высвобождением.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-34-50221_мол_нр).

Литература

1. Ochs M., Carregal-Romero S., Rejman J., Braeckmans K., De Smedt S.C., Parak W.J. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2013, 52, 695.
2. Caruso F., Caruso R. A., Möhwald H. *Science* 1998, V. 282, P. 1111
3. Kazakova L.I., Shabarchina L.I., Sukhorukov G.B. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011. V.13. P. 11110.

8.14 РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФИТОПАТОГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПОТЕНЦИАЛЬНО ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ

Кабанова А.П.^{1,2}, Ширишиков Ф.В.^{1,2}, Баранник А.П.^{1,2}, Во Тху Нгок Ха²,
Шнейдер М.М.¹, Игнатов А.Н.², Мирошников К.А.^{1,2}

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

²Исследовательский центр "ФитоИнженерия", с. Рогачево, Московская обл.
Электронный адрес: asiasay@yandex.ru

Большой проблемой для картофелеводства является порча урожая в результате распространения гнилостных инфекций "черной ножки" и "мягкой (мокрой) гнили", вызываемых фитопатогенными бактериями. Для внедрения методов интегрированной (в т.ч. биологической) защиты растений необходимы точная диагностика и мониторинг распространения фитопатогенов, изучение механизмов инфицирования их бактериофагами, изучение биологических показателей фитопатогенов и бактериофагов.

В ходе работы была проанализирована коллекция из 165 картофельных фитопатогенных бактерий, и на основании физиологических признаков, RAPD-типирования геномов и частичного секвенирования гена 16S рРНК было выявлено 26 групп микроорганизмов.

Было установлено, что бактериофаги обладают групповой специфичностью - на каждую группу бактерий приходится свой бактериофаг (или несколько), что может свидетельствовать об общности рецепторов на поверхности бактериальных клеток.

Также были изучены и аннотированы геномы бактериофагов PP 16 и PP 90, определены их биологические характеристики.

Работа поддержана грантом РФФ № 16-16-00073.

8.15 САЙТ-НАПРАВЛЕННОЕ ПЕГИЛИРОВАНИЕ scFv-ФРАГМЕНТОВ GD2-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ

Калиновский Д.В.¹, Доронин И.И.¹, Холоденко И.В.^{1,2},
Молотковская И.М.¹, Холоденко Р.В.^{1,3}

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

²НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

³ООО "Реал Таргет"

Электронный адрес: dcalinovschi@yahoo.com

Ранее нами были проведены исследования, показавшие, что различные GD2-специфичные моноклональные антитела индуцируют клеточную гибель в опухолевых клетках, несущих данный антиген [1]. Фрагменты GD2-специфичных антител сохраняют способность индуцировать цитотоксические эффекты в опухолевых клетках. Они ингибируют пролиферацию GD2-позитивных клеток в дозозависимой манере и обладают противоопухолевым потенциалом в экспериментах *in vivo* [2, 3]. Недостатком использования фрагментов антител в противоопухолевой терапии является их быстрое выведение из организма. Одним из наиболее часто применяемых методов увеличения времени циркуляции в организме является пегилирование белков. Ранее в своей работе мы провели сайт-направленное пегилирование Fab-фрагментов антител и показали, что оно не оказывало значительного влияния на связывание фрагментов с антигеном и проявление цитотоксических эффектов, а время циркуляции в крови мышей линии Balb/c увеличивалось по сравнению с немодифицированными Fab-фрагментами.

Нами были получены scFv-фрагменты GD2-специфичных антител, которые имеют потенциальные терапевтические преимущества по сравнению с Fab-фрагментами. В структуру рекомбинантных scFv-фрагментов был введен концевой неспаренный цистеин для сайт-направленной модификации по данному остатку. Было проведено сайт-направленное пегилирование полученных scFv-фрагментов GD2-специфичных антител с использованием различных по структуре молекул малеимид-ПЭГ, а также оценка связывания модифицированных и немодифицированных фрагментов с ганглиозидом GD2 с применением ИФА и проточной цитофлуориметрии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-29-01300.

Литература

1. Doronin I.I., Vishnyakova P.A., Kholodenko I.V., Molotkovskaya I.M., Ponomarev E.D., Kholodenko R.V. // BMC Cancer. 2014. 14:295.
2. Доронин И.И., Холоденко И.В., Молотковская И.М., Холоденко Р.В. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. Т. 11. С. 616-622.
3. Холоденко И.В., Доронин И.И., Вишнякова П.А., Болховитина Е.Л., Молотковская И.М., Холоденко Р.В. // Иммунология. 2013. Т. 4. С. 199-203.

8.16 ВЛИЯНИЕ ПОЛИАМИНОВ НА АГРЕГАЦИЮ АЛЬФА-ЛАКТАЛЬБУМИНА, ИНДУЦИРУЕМУЮ ДИТИОТРЕИТОЛОМ

Кара Д.А., Борзова В.А., Маркосян К.А., Курганов Б.И.

ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва

Электронный адрес: karabatnet@gmail.com

Одной из актуальных задач биотехнологии является поиск агентов, которые способны контролировать агрегацию ненативных форм белков, образующихся при воздействии различных агентов и факторов внешней среды на препараты белков. Среди подобных агентов несомненный интерес представляют биогенные полиамины, выступающие в роли регуляторов синтеза белка, клеточного роста и дифференцировки.

В качестве тест-системы, используемой для оценки антиагрегационной активности полиаминов, была выбрана агрегация альфа-лактальбумина, индуцируемая дитиотреитолом (ДТТ) (100 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 6.8, 20 мМ ДТТ, концентрация альфа-лактальбумина 1 мг/мл). За кинетикой агрегации следили по увеличению интенсивности светорассеяния (I) при длине волны 632.8 нм. Начальные участки кинетических кривых описывали квадратичным уравнением вида: $I = [K_{LS}(t - t_0)]^2$, где t_0 - длительность лаг периода. Параметр K_{LS} использован в качестве меры начальной скорости агрегации. Показано, что зависимость параметра K_{LS} от начальной концентрации белка $[P]_0$ описывается степенной функцией: $K_{LS} = \text{const} [P]_0^a$. Показатель степени a определен равным 2.5 ± 0.2 . Полученное значение a может быть интерпретировано как указание на то, что скорость-лимитирующей стадией общего процесса агрегации является стадия агрегации денатурированных молекул белка. В настоящей работе изучена кинетика ДТТ-индуцируемой агрегации альфа-лактальбумина в присутствии путресцина и спермидина. Влияние полиамина (L) на скорость агрегации анализировали в координатах $\{(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/a}, [L]\}$, где $K_{LS,0}$ - величина K_{LS} в отсутствие полиамина. Показано, что полиамины оказывают двоякое действие на скорость агрегации. Зависимости $(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/a}$ от концентрации полиамина проходят через максимум. Максимальные значения $(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/a}$ при [путресцин] = 100 мМ и [спермидин] = 50 мМ составляют 2.0 и 2.6, соответственно. При относительно высоких концентрациях (600-800 мМ) полиамины перестают оказывать влияние на скорость агрегации. Показано существование корреляции между величиной $(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/a}$, характеризующей начальную скорость агрегации, и длительностью лаг-периода t_0 .

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-34-00997-мол_a).

8.17 СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ ВЫЗЫВАЕТ ФОРМИРОВАНИЕ IgG, НО НЕ СНИЖАЕТ УРОВЕНЬ IgE АНТИТЕЛ

Каширина Е.И., Чудаков Д.Б., Коцарева О.Д., Фаттахова Г.В., Свирицевская Е.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: Helen-kas@mail.ru

Основным патогенетическим методом лечения аллергии является специфическая иммунотерапия (АСИТ), основанная на введении низких доз экстрактов аллергенов. Механизмы АСИТ до конца не ясны. Основной гипотезой является формирование IgG (у человека IgG4) антител, которые препятствуют дальнейшему формированию IgE продуцирующих В-клеток.

Целью данной работы являлось изучение продукции IgG и IgE антител в низкодозовой модели аллергии на мышах после проведения АСИТ.

У мышей линии BALB/c формировали аллергию 12-ти кратным введением 100 нг смеси Asp f 2 и Asp f 3 (Af) подкожно в область холки 3 раза в неделю. Определяли наличие IgE, после чего мышей иммунизировали однократно смесью Af в гидроокиси алюминия (ГА) или 3 раза с интервалом в 1 неделю в виде наночастиц (НЧ), содержащих капсулированные белки Af (Af-НЧ). Контрольных мышей с аллергией не вакцинировали. Динамику изменения уровня аллерген-специфических IgG1, IgG2a и IgE антител оценивали методом ИФА в сыворотках, взятых на 2, 3, 6, 16, 20 неделях после терапии. Для анализа легочной реакции перед забоем мышей сенсибилизировали интраназально в течение 5 дней.

Показали, что при иммунизации мышей с аллергическим IgE ответом как Af в ГА, так и в составе НЧ наблюдается резкое увеличение титров IgG1 и IgG2a антител уже на второй неделе после иммунизации, который длительно сохраняется (>5 месяцев). В то же время, титр Af специфичных IgE снижался незначительно. В группе мышей, иммунизированных Af в ГА, наблюдалась острая, но не летальная анафилактическая реакция в течение 15-30 минут после введения аллергена. В группе Af-НЧ такой реакции не было, что показывает безопасность проведения АСИТ капсулированными аллергенами. Гистологический анализ легких показал значительно меньшее воспаление в легких иммунизированных мышей обеих групп по сравнению с группой контроля. Таким образом, показали, что АСИТ не приводит к снижению продукции IgE, но оказывает терапевтический эффект, что соответствует результатам АСИТ у людей с аллергией.

Работа проведена при поддержке гранта РНФ № 16-14-00136.

8.18 ИЗУЧЕНИЕ ДИССОЦИАЦИИ ОБОЛОЧКИ НЕБИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ

Ким А.Д.^{1,2}, Тихоненко С.А.², Мусин Е.В.^{1,2}, Дубровский А.В.²

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

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
Электронный адрес: kimerzent@gmail.com

Целью данной работы является изучение диссоциации оболочки, состоящей из полиаллиамина (ПАА) и полистиролсульфоната (ПСС).

Для получения полиэлектролитных микрокапсул использовался метод поочередного наслаивания противоположно заряженных полиэлектролитов (ПАА, ПСС) на дисперсные частицы нано- и микро размеров, которые удаляются на финальной стадии приготовления. Методом флуоресцентной спектроскопии исследована деградация оболочки полиэлектролитных микрокапсул в присутствии солей сульфата аммония и хлорида натрия разных концентраций, а также при двух значениях pH.

Установлено, что высокая концентрация хлорида натрия (2 М) приводит к значительной диссоциации ПАА с верхнего слоя оболочки, что, по-видимому, связано с ее разрыхлением под экранирующим воздействием ионов на сульфогруппы полиэлектролитов. В то же время 0.2 М хлорид натрия и сульфат аммония такой же ионной силы (0,1 М) не вызывают увеличения количества диссоциировавшего полимера, а значит и разрушения оболочки микрокапсул.

Повышение pH раствора до 7,5 также вызывает отслаивание ПАА, подобное поведение оболочки объяснено тем, что данное значение pH находится близко к точке перезарядки аминогруппы, что приводит к ослаблению связей между NH₃⁺ и SO₃⁻ группами полиэлектролитов. Эффект уменьшается примерно в 2 раза при повышении температуры до 37° С, что может быть связано с нагревом оболочки микрокапсул, которая утолщается из-за уменьшения количества несвязанных между собой "хвостов" и "петель" полиэлектролитов и приводит к увеличению ее устойчивости.

Полученные данные позволяют улучшить и разнообразить существующие конструкции микрокапсул, что приведет к решению как научных, так и прикладных задач.

8.19 ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ НА ГЕМОГЛОБИН И ДИНАМИКИ ЕГО ВЫХОДА ИЗ МИКРОКАПСУЛ В ПРОЦЕССЕ СОЗДАНИЯ ГАЗОТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ ЧЕЛОВЕКА

Ким А.Д.^{1,2}, Тихоненко С.А.², Мусин Е.В.^{1,2}, Дубровский А.В.²

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

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
Электронный адрес: kimerzent@gmail.com

Целью данной работы являются разработка методики капсулирования гемоглобина в полиэлектролитных микрокапсулах с сохранением его химических свойств и изучение динамики выхода белка из полученных микрокапсул. Инкапсулированный гемоглобин позволит разработать искусственную газотранспортную систему. Данная разработка в перспективе позволит отказаться от донорской крови и сделает процедуру гемотрансфузии гораздо более доступной.

Кровезаменитель выполнен в виде ансамбля полиэлектролитных микрокапсул (ПЭ-микрокапсул) с включенным в них гемоглобином, оболочки которых состоят из чередующихся слоев поликатиона и полианиона. Нашей первоочередной задачей являлось исследование функционального состояния гемоглобина в присутствии полиэлектролитов: полиаллиамина (ПАА), полистароссульфоната (ПСС) и декстрансульфата (ДС).

Функциональное состояние гемоглобина определяли по изменению окружения гема, наблюдаемое по изменению спектра в полосе Soret. Структуру белка изучали методами собственной флуоресценции и методом кругового дихроизма. Также методом флуоресцентной спектроскопии исследовали динамику выхода белка из полиэлектролитных микрокапсул в присутствии солей сульфата аммония и хлорида натрия разных концентраций, а также при двух значениях pH.

Показано, что ПСС полностью ингибирует гемоглобин, разрушая его третичную структуру, при этом α-спиральная структура сохраняется, в то время как ПАА и ДС не влияют на структуру и функциональные свойства белка. Данное обстоятельство позволяет говорить о возможности включения гемоглобина в полиэлектролитные микрокапсулы без потерь их функциональных свойств.

На основе полученных данных была отработана методика капсулирования гемоглобина в полиэлектролитные микрокапсулы, сформированные из трех типов полиэлектролитов ПСС, ПАА, ДС и имеющих формулу (ПАА/ДС)3ПСС. Было показано, что инкапсулированный белок практически не выходит из полученных микрокапсул вне зависимости от присутствия в среде солей и их концентрации.

Полученные результаты лягут в основу создания искусственной газотранспортной системы и позволят начать изучение газотранспортных свойств инкапсулированного гемоглобина.

8.20 ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ И РАДИКАЛЬНОГО СШИВАНИЯ БЕЛКОВ НА ПОВЕРХНОСТИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Допухова М.В., Бычкова А.В., Милютин А.Н., Данилова Т.А., Акинфиев В.С., Чукунова А.П., Пронкин П.Г., Розенфельд М.А.

Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва
Электронный адрес: mahlop1@yandex.ru

Магнитные наночастицы (МНЧ) имеют широкий спектр применения в медицине и биологии. Белковое покрытие позволяет защитить частицы, придает им свойство биосовместимости, предотвращает агрегацию наносистем в дисперсии [1]. Проведено исследование влияния факторов на адсорбцию и сшивание макромолекул белков на МНЧ методами спектрофотометрии и динамического светорассеяния. Для оценки генерации ОН⁻ на поверхности МНЧ использовали о-фенилендиамин. В ходе работы для получения белковых покрытий на поверхности МНЧ использованы бычий сывороточный альбумин (БСА), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) и иммуноглобулин G (IgG). Работы проводились в 0,05 М фосфатном буфере с рН 5,8-7,4 в наличии и отсутствии 0,15 М NaCl. С помощью фибриногена (ФГ) проводили проверку прочности сформировавшегося покрытия на поверхности МНЧ [2].

На основании полученных данных по зависимости устойчивости покрытий из БСА, ЧСА, IgG от соотношения белок/наночастицы, продолжительности инкубации, влияния температуры (в диапазоне 10-32 С), рН среды и ионной силы сделаны выводы о предпочтительных условиях получения устойчивых покрытий. С помощью флуоресцентных зондов ТКБ(3,3'-ди-(γ-сульфопропил)-4,5,4',5'-дифензо-9-этилтиакарбоцианин-бетаин) и ОКБ(3,3'-ди-(γ-сульфопропил)-5,5'-дифенил-9-этилоксакарбоцианин-бетаин) получены данные о высоких эффективных концентрациях альбумина в системах МНЧ+белок.

Работы по созданию белковых покрытий на магнитных наночастицах, разработка подходов к контролю генерации свободных радикалов выполняются при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы (проект № 15-33-70019 "мол_а_мос"). Исследование структурной и химической модификации белков на поверхности нанообъектов выполняется при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-34-60244 мол_а_дк). Спектрально-флуоресцентные измерения проводятся при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-03-00735).

Литература

1. А.В. Бычкова, О.Н. Сорокина, М.А. Розенфельд, А.Л. Коварский. Многофункциональные биосовместимые покрытия на магнитных наночастицах. Успехи химии 2012, 81 (11), с. 1026-1050.
2. А.В. Бычкова, О.Н. Сорокина, А.Л. Коварский, В.Б. Леонова, М.А. Розенфельд. Взаимодействие белков плазмы крови с наночастицами магнетита. Коллоидный журнал, 2010, том 72, № 5, с. 694-700.

8.21 ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИТОЗАНА С ФЕНОЛЬНЫМИ КИСЛОТАМИ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ

Дуньков А.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Варламов В.П.

ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" (Институт биоинженерии РАН, Москва)
Электронный адрес: fwnfl994@gmail.com

Природные полифенольные соединения известны прежде всего, благодаря своим антиоксидантным свойствам. Фенольные кислоты являются важной группой веществ, входящей в ряд полифенольных соединений. Они широко изучены на предмет различных биологических активностей: антиоксидантная, антибактериальная, противоопухолевая и др. Однако, несмотря на это, обладают рядом недостатков, таких, как химическая нестабильность, низкая биодоступность, слабое сродство к клеточной мембране.

Использование биополимера ? хитозана в качестве носителя для полифенольных кислот поможет преодолению перечисленных недостатков, а также будет способствовать сохранению и усилению проявляемой антиоксидантной, антибактериальной активностей и проникновению конъюгатов в клетку. Биополимер хитозан является подходящим носителем для химической модификации.

В данной работе был синтезирован конъюгат алкилированного производного хитозана с полифенольной кислотой. Сначала было получено алкилированное производное хитозана, затем карбодимидным методом осуществлена конъюгация с галловой кислотой. Таким образом, были увеличены растворимость и антиоксидантная активность исходного хитозана с молекулярной массой 28 кДа и степенью дезацетилирования 85%, а также изучена хелатирующая способность полученных образцов.

8.22 СОЗДАНИЕ БЕЛКОВЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОКОМПЬЮТЕРНЫХ СТРУКТУРАХ

Моисеев Я.П.¹, Никитин М.П.^{1,2}, Деев С.М.¹

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

²Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва

Электронный адрес: yaroslav.moiseev.p@gmail.com

Повышенной избирательностью по сравнению с традиционными способами направленной доставки соединений для задач биомедицины обладает направленная доставка, действие которой основывается на молекулярном биокомпьютинге [Nikitin et al., *Nat. Nanotech.*, 2014]. Перспективными компонентами биокомпьютерных комплексов, состоящих из наночастиц и биомолекул, для применения в живых организмах являются белковые наночастицы ввиду их биоразлагаемости и биосовместимости, а также наличия большого количества различных функциональных групп, опосредующих биомодификацию наночастиц.

Одной из наиболее важных характеристик работы биокомпьютерного комплекса является эффективность его разборки, которая и опосредует функционирование комплекса и его отклик на молекулярные входные сигналы. Значительное влияние на результативность разборки оказывает природа наночастиц в составе комплекса. Например, представляется перспективным использование для этой цели наночастиц из неденатурированного белка. Задачей данной работы был синтез и характеристика таких частиц.

Наночастицы из бычьего сывороточного альбумина получали путём кросс-сшивки белка глутаровым альдегидом. Для стабилизации наночастиц свободные альдегидные группы блокировали глицином, основания Шиффа восстанавливали цианоборгидридом натрия. Был исследован ряд условий, влияющий на синтез частиц, таких как: pH, концентрации действующих веществ, время синтеза и подобраны оптимальные условия для создания наночастиц.

Таким образом, в работе был разработан новый метод синтеза наночастиц, основанный на кросс-сшивке без денатурации белка. Данный метод может быть использован для получения наночастиц из разнообразных белков, денатурация которых в ходе создания наночастиц нежелательна.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научных проектов № 14-24-00106 (синтез наночастиц) и № 16-19-00131 (исследование биокомпьютерных комплексов).

8.23 РАЗРАБОТКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМ МНОГОКРАТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Мусин Е.В.^{1,2}, Тихоненко С.А.², Ким А.Л.^{1,2}, Дубровский А.В.²

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

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
Электронный адрес: eglork@gmail.com

Целью работы является создание нового типа сенсорных систем многократного использования, удобных для применения в медицинской диагностике и мониторинга биотехнологического производства. Такие сенсорные системы выполнены на основе полиэлектролитных нано- и микрокапсул (ПМК), закрепленных на твердом носителе и содержащих внутри своего пула каталитически активные ферменты. Комплекс, образованный таким путем, представляет собой диагностическую пластину (ДП).

Закрепление ПМК на твердом носителе стало возможным в результате проведенных экспериментов по нанесению полимерных слоев на кварцевую пластину. В работе использовали полиэлектролиты: полистиролсульфонат натрия (ПСС), полиаллиламин гидрохлорид (ПАА), полиэтиленимин (ПЭИ).

ПМК, содержащие фермент, получали путем поочередной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на составных микросферолитах СаСО₃-фермент, используемых в качестве ядра, который затем растворяли в ЭДТА.

Активным компонентом ДП является фермент, инкапсулированный в ПМК. Структура полимерных слоев ДП полупроницаема, что позволяет сохранить доступ анализируемого субстрата к реакционным центрам фермента, одновременно фермент изолирован от действия протеолитического воздействия внешней среды. Таким образом, данная диагностическая пластина может использоваться как многократный инструмент диагностики, не требующий предварительных очисток анализируемого раствора.

Результаты, полученные при многократном применении диагностической пластины, показали, что свойства инкапсулированной уреазы сохраняются независимо от количества инкубаций. Отклонения результатов не превышают порога в 8,75%, что полностью удовлетворяет требованиям МЗиСР РФ.

8.24 ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ В РАМКАХ РАЗРАБОТКИ МЕДИЦИНСКИХ И ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРОДИАГНОСТИКУМОВ МНОГОКРАТНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Мусин Е.В.^{1,2}, Ким А.Л.^{1,2}, Тихоненко С.А.², Дубровский А.В.²

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

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
Электронный адрес: eglork@gmail.com

Целью работы является изучение каталитических свойств алкогольдегидрогеназы (АДГ) при ее взаимодействии с полиэлектролитами (ПЭ) в растворах с различной ионной силой. Данное исследование является собой новый виток развития технологии создания полиэлектролитных микрокапсул (ПМК) с инкапсулированными ферментами, которые станут достойной заменой нативных ферментов в клинико-биохимической диагностике и мониторинге биотехнологического производства.

В рамках данной работы изучено влияние отрицательно заряженных полистиролсульфоната (ПСС) и декстрансульфата (ДС) и положительно заряженного полидиаллилдиметиламмония (ПДАДМА) на структуру и активность АДГ методами флуоресцентной и оптической спектроскопии.

Показано, что ДС и ПДАДМА не влияют на структурные и каталитические свойства фермента. ПСС за 1 ч инкубации незначительно снижал величину собственной флуоресценции белка, что связано с частичным разрушением его четвертичной структуры (глобулярности).

Изучение АДГ в свободном состоянии и в присутствии ПСС показало, что активность фермента зависела как от времени инкубации, так и от влияния ПСС. Также было обнаружено, что в присутствии ПСС фермент инактивировался значительно сильнее, чем свободный, при этом соотношение полиэлектролита к белку не влияло на активность фермента.

Продемонстрировано, что добавление в реакционную смесь хлорида натрия (2 М и 0.2 М) или сульфата аммония (0.1 М) не уменьшало разрушающего действия ПСС на четвертичную структуру белка, но в то же время частично снимало негативное влияние ПСС на активность отдельных субъединиц за счет предотвращения образования дисульфидных мостиков между сульфогидрильными ($-SH$) группами.

Изученные взаимодействия ПЭ с АДГ имеют принципиальное значение для развития технологии конструирования полиэлектролитных ферментных микродиагностик.

8.25 ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ И КОМПОЗИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ МЕТОДОМ НАНОПРЕЦИПИТАЦИИ

Павлова Е.Р.^{1,2}, Морозова О.В.², Багров Д.В.^{2,3}, Клинов Д.В.^{1,2,4}

¹Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва

²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

³Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва

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

Электронный адрес: elizaveta.r.pavlova@phystech.edu

Белковые наночастицы, будучи биосовместимыми и биодegradуруемыми, имеют множество потенциальных биомедицинских приложений. Они могут использоваться в иммунодиагностике, в качестве адъювантов вакцин, терапевтических агентов и носителей для направленной доставки и пролонгированного действия. Белковые наночастицы имеют ряд преимуществ по сравнению с аналогами из синтетических полимеров, поскольку они естественно метаболизируются и не вызывают токсикологических проблем, а также в большинстве случаев не нуждаются в функционализации поверхности благодаря многообразию функциональных групп.

Цель данной работы - получение белковых наночастиц методом нанопреципитации и их характеристика.

Метод нанопреципитации был модифицирован и оптимизирован для получения белковых наночастиц. Показан высокий выход водорастворимых частиц при отсутствии белка в растворе.

Наночастицы были получены из бычьего сывороточного альбумина (БСА), фибриногена и полилизина. Изучена морфология частиц методами сканирующей электронной микроскопии и атомно-силовой микроскопии. Частицы, полученные нанопреципитацией, имеют сферическую форму и размеры в диапазоне от 30 до 250 нм, стабильны в течение нескольких месяцев при хранении при +4°C. Доказана белковая природа наночастиц с помощью УФ-спектроскопии и элементного анализа. Обнаружена стабильность белковых наночастиц в течение нескольких месяцев при хранении при +4°C. Также получены композитные наночастицы, состоящие из наночастиц серебра и золота, окруженных оболочкой БСА. Толщина белкового слоя уменьшается при снижении концентрации БСА.

Таким образом, модифицированный метод нанопреципитации пригоден для получения стабильных водонерастворимых наночастиц из белков различной структуры (глобулярного, фибриллярного и линейного полипептида), а также композитных наночастиц с коллоидами благородных металлов.

8.26 ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЕ МЕЧЕНИЕ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ, ОПОСРЕДОВАННОЕ ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИЕЙ ИСКУССТВЕННЫХ АЛЬФА-СПИРАЛЕЙ

Перфилов М.М., Гурская Н.Г., Клементьева Н.В., Мишин А.С., Лукьянов К.А.

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

Электронный адрес: sufrep@gmail.com

В настоящее время флуоресцентные белки широко используются для мечения клеточных структур, визуализации клеточных процессов. Однако традиционно используемые для этого белки слияния флуоресцентных белков с целевыми имеют ряд недостатков, в частности, фотообесцвечивание флуоресцентных меток и низкая плотность мечения. Одним из способов преодолеть данные недостатки может быть использование транзиентных, то есть слабо взаимодействующих с целевыми клеточными структурами, меток.

В данной работе мы предлагаем новый метод мечения целевых белков, основанный на гетеродимеризации искусственных спиралей, состоящих из 3-4 повторяющихся гептад (К/Е-спиралей). Метод предполагает коэкспрессию целевого белка, связанного с К-спиралью, и флуоресцентного белка, связанного с Е-спиралью. При этом взаимодействие К- и Е-спиралей должно обеспечивать колокализацию целевого и флуоресцентного белков. Прочность связывания таких гетеродимерных комплексов зависит от аминокислотного состава гептад и их количества.

На первом этапе работы был получен набор генетических конструкций, содержащих зелёный и красный флуоресцентные белки с К- и Е-спиралью. В качестве модельных систем для определения свойств гетеродимеризующихся спиралей были выбраны белки цитоскелета (актин, виментин) и гистоны (H2B). Взаимодействие К/Е-спиралей оценивалось по колокализации сигналов, один из которых имел чётко выраженную внутриклеточную локализацию (цитоскелетные волокна, хроматин), а второй не имел сигналов локализации. Помимо этого, измерялось время полувосстановления флуоресценции после фотообесцвечивания участка цитоскелетного волокна или ядра. Данная серия экспериментов позволила подобрать пары К/Е-спиралей, позволяющих, с одной стороны, специфично пометить клеточные структуры, а с другой - совершался достаточно быстрый (в секундной шкале) обмен белков в гетерокомплексах. Эти пары были успешно применены для визуализации цитоскелета в различных режимах: конфокальной микроскопии, микроскопии полного внутреннего отражения флуоресценции (TIRFM), микроскопии сверхвысокого разрешения на основе детекции одиночных молекул.

Такая система мечения внутриклеточных структур открывает новые возможности в микроскопии сверхвысокого разрешения. Стабильность меток позволяет проводить длительную съёмку внутриклеточных структур.

8.27 ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ШТАММА МИКРОВОДОРОСЛИ - ПЕРСПЕКТИВНОГО ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОДУЦЕНТА ФУКОКСАНТИНА

Петрушкина М.А., Мамаева А.С., Сорокин Б.А., Филимонова А.В., Зотько Н.С., Намсараев З.Б., Кузьмин Д.В.

ООО "Соликсент", Москва

Электронный адрес: Petrushkina.m@solixant.com

Каротиноиды являются важнейшими природными антиоксидантами, активно применяющимися в косметологии, медицине, аквакультуре и производстве пищевых добавок. Наиболее ценными каротиноидами считаются астаксантин и фукоксантин (до 7 тысяч долларов за кг). Природными продуцентами этих каротиноидов являются микроводоросли.

В ходе работы было исследовано 8 штаммов морских и пресноводных микроводорослей, выделенных в чистую культуру из водоёмов России и Вьетнама. Для определения содержания каротиноидов применялась экстракция с использованием различных растворителей и последующим анализом экстрактов методом ВЭЖХ.

Концентрация фукоксантина в исследованных штаммах варьировала от 0.6 до 26.3 мг на 1 сухой массы. Максимальное содержание фукоксантина было обнаружено в штамме SBV-13, тогда как содержание фукоксантина в остальных исследуемых штаммах не превышало 5.3 мг/г.

Количество биомассы и содержание фукоксантина могут варьировать в зависимости от условий культивирования и стадии роста. В связи с этим была проведена оптимизация состава среды и условий культивирования штамма SBV-13. Было показано, что оптимальными условиями являются: температура 24°C, постоянная скорость перемешивания 150 оборотов/мин, 5% CO₂ в газо-воздушной смеси, освещение 160 мкмоль/м²/с и световой режим 16 ч день/8 ч ночь. Оптимальное содержание макроэлементов в модифицированной среде WC: PO₄³⁻ - 1.0 ммоль/л, NO₃⁻ - 0.2 ммоль/л, SiO₃²⁻ - 0.075 ммоль/л.

В результате исследования было показано, что штамм SBV13 содержит наибольшее количество фукоксантина в сухой биомассе среди исследованных штаммов. В том числе он превосходит штамм *Phaeodactylum tricorutum* UTEX L642, используемый в промышленном производстве, в 2.5 раза. Кроме того, полученная величина является наибольшей среди всех изученных к настоящему времени штаммов. В сочетании с высокой продуктивностью это делает SBV-13 одним из наиболее перспективных новых промышленных продуцентов фукоксантина.

8.28 РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ИММУНО-ПЦР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА E К КЛЕЩАМ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ И ПЛЕСЕНИ

Пивоваров В.Д., Симонова М.А., Рязанцев Д.Ю.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: Pivovarov94@mail.ru

Наблюдаемый в последние 40 лет эпидемический рост аллергических заболеваний с тяжелыми формами течения делает необходимым создание новых методов ранней диагностики аллергических реакций. Анализ содержания IgE антител в сыворотке крови с использованием серологических методов является неотъемлемой частью диагностической оценки аллергических заболеваний у пациента. Основным методом измерений уровней общего и специфического IgE в сыворотке крови является твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Зачастую чувствительности ИФА бывает недостаточно для определения IgE ввиду их низкой аффинности, и/или если их уровень в сыворотке крови пациента, страдающего аллергией, достаточно низкий. Иммуно-ПЦР (иПЦР) сочетает в себе преимущества как ИФА, так и ПЦР, и представляет собой мощный метод обнаружения различных аналитов в низких концентрациях. В иПЦР используются специфические антитела, меченные ДНК. Количество связанной с антигеном ДНК-метки можно определить с помощью количественной ПЦР. Данный подход, как правило, позволяет в 10-1000 раз увеличить чувствительность детекции аналита по сравнению с иммуноферментным анализом. В данной работе мы исследовали возможность применения метода иммуно-ПЦР для детекции IgE антител к бытовым респираторным аллегенам *Dermatophagoides farinae* (клещи домашней пыли) и *Alternaria alternata* (плесневый гриб).

Формат метода соответствовал непрямому твердофазному ИФА с применением биотинилированных анти-IgE антител. В качестве детектирующей метки использовался супрамолекулярный комплекс биотинилированной с 5' и 3' концов ДНК и стрептавидина. Обнаружение связанной ДНК-метки проводилось методом количественного ПЦР-анализа в реальном времени. Определяли IgE антитела связывающиеся с рекомбинантными белками Der f1 и Der f2 (аллергены *D. farinae*) и с рекомбинантным белком Alt a1, (аллерген *A. alternata*).

В исследованиях использовали две панели сывороток крови людей, страдающих аллергией. Первая панель - сыворотки с подтвержденным с помощью тестов RIDA AllergyScreen и ИФА наличием IgE к используемым аллергенам. В качестве второй панели использовали сыворотки аллергиков, у которых в этих же тестах IgE к данным аллергенам не были обнаружены.

Для подтверждения точности разработанного метода использовалась первая панель сывороток крови. Иммуно-ПЦР позволил корректно определить IgE к данным аллергенам во всех исследуемых сыворотках. Титры IgE к аллергенам Der f2 и Alt a1, определенные методом иПЦР составили 250-1250 и

2400-19200, соответственно, в то время как титры, определенные методом ИФА, составляли 400-2000 и 1000-5000. Таким образом, чувствительность метода иПЦР была сравнима или превосходила чувствительность ИФА для сывороток с высоким титром IgE. Для дальнейшей оценки чувствительности метода использовали вторую панель сывороток. Данный метод позволил достоверно определить наличие IgE-антител к выше указанным аллергенам в части исследуемых сывороток. Следует отметить, что в сыворотках здоровых людей IgE методом иПЦР, выявить не удалось. Полученные данные говорят о большей чувствительности метода иПЦР по сравнению с ИФА и тестом RIDA AllergyScreen. Разработанный метод может быть использован в диагностике аллергических заболеваний и фундаментальных исследованиях аллергии как альтернатива ИФА.

Исследование выполнено за счет гранта РНФ № 16 14-00136 и стипендии Президента РФ СП-4413.2015.4.

8.29 ВЛИЯНИЕ ТОКСИН-АНТИТОКСИНОВОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЭЛЕМЕНТА НА УРОВЕНЬ И ДИНАМИКУ БИОСИНТЕЗА ИНТЕРФЕРОНА β ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Пискарева А.А., Орлова Н.А., Ходак Ю.А., Воробьев И.И.

ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” (Институт биоинженерии РАН, Москва)

Электронный адрес: piskareva.arisha2010@yandex.ru

В настоящее время множество важных для медицины человеческих белков можно получать с помощью методов генетической инженерии, используя клетки-продуценты, в частности бактерии *E. coli*. Часть из этих белков оказывается достаточно токсичной для бактерии-хозяина, что существенно ограничивает продуктивность бактериальных систем экспрессии генов таких белков. Экспрессия гена токсичного гетерологического белка повышает вероятность потери бактериальной клеткой всех копий плазмиды, что приводит к быстрому замещению в культуре клеток-продуцентов быстро делящимися непродуцирующими клетками. Таким образом, продуктивность биосинтеза некоторых рекомбинантных человеческих белков в бактериальных клетках может быть увеличена за счет повышения сегрегационной устойчивости плазмид, кодирующих гены этих белков. Один из возможных способов увеличения сегрегационной устойчивости плазмиды - это включение в ее состав токсин-антитоксिनного локуса, например, пары генов *hok/sok*, относящихся к токсин-антитоксин системам I типа. Ранее на основе плазмиды pET28a нами был сконструирован вектор pHYR, содержащий локус *hok/sok* в положении даунстрим от промотора T7lac. Данный вектор обладал увеличенной в несколько раз сегрегационной устойчивостью, однако не изменял достоверным образом уровень биосинтеза модельного белка - укороченного варианта тканевого активатора плазминогена человека. Было предположено, что вектор pHYR может позволить увеличить уровень биосинтеза более токсичного для клеток белка.

Результаты. На основе вектора pHYR была получена экспрессионная плаزمида pHYR-MBIF, содержащая ген целевого белка - интерферона β человека и штамм-продуцент BL(21)DE3/pHYR-MBIF. Данный штамм позволял синтезировать на 45% больше интерферона β , чем контрольный штамм, содержащий тот же синтетический ген интерферона β в составе плазмиды pET28. Также было установлено, что после 3 ч индукции клеток 1 mM ИПТГ плазмиду сохраняет в 3 раза больше клеток штамма BL(21)DE3/pHYR-MBIF, что может объяснять видимую разницу в динамике накопления целевого белка.

Выводы. Увеличенная продуктивность штамма BL(21)DE3/pHYR-MBIF связана с лучшим удерживанием плазмиды клетками в процессе индукции. Плазмидные векторы с генетическим элементом *hok/sok* могут быть применены для увеличения уровня биосинтеза различных токсичных для хозяина белков в бактериальной системе экспрессии.

8.30 ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ СЕНСОР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗЫ) В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ

Подвальная Н.М., Серебровская Е.О., Шрам С.И., Лукьянов К.А.

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

Электронный адрес: npodvalnaya@gmail.com

Поли(АДФ-рибоза) (ПАР) - биополимер, который образуется в клетках всех эукариот, кроме дрожжей, в ответ на повреждение ДНК и участвует в процессе ее репарации. Повышение уровня ПАР в клетке может служить маркером клеточного стресса, изучение которого важно для выявления механизмов возникновения патологических процессов, например сахарного диабета и рака. Целью нашей работы было создать флуоресцентный сенсор, позволяющий неинвазивно детектировать образование ПАР в живой клетке.

В качестве сенсоров планировалось использовать пары химерных белков на основе флуоресцентных белков и природных ПАР-связывающих доменов. В качестве ПАР-связывающих структур мы выбрали ПАР-связывающий мотив (PAR-binding motif, PBM) белка p53 и WWE-домен белка RNF146. В качестве флуоресцентных белков, способных к Ферстеровскому резонансному переносу энергии (FRET), использовались циановый белок mTurquoise2 (FRET-донор) и желтый белок mVenus (FRET-акцептор). Мы ожидали, что при образовании ПАР оба химерных белка будут связываться с ней, и за счёт их близкого взаиморасположения будет возникать FRET-сигнал.

Был создан ряд плазмид, кодирующих химерные белки. Созданные плазмиды попарно котрансфецировали в эукариотические клетки культур остеосаркомы человека U2OS и крысиных кардиомиоцитов H9C2. Флуоресцентную микроскопию живых клеток проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа и лазерного сканирующего конфокального микроскопа.

Было обнаружено, что эффективное взаимодействие с ПАР происходит только в случае использования WWE домена RNF146 в качестве ПАР-связывающего домена. При воздействии ультрафиолетового излучения или перекиси водорода (известных индукторов образования ПАР) в обеих клеточных культурах наблюдалось перераспределение флуоресцентного сигнала из цитоплазмы в ядро, а также возникновение FRET-сигнала. Селективность связывания химерных белков с ПАР была подтверждена отсутствием транслокации флуоресцентного сигнала в клетках, подвергнутых воздействию индукторов ПАР, и трансфецированных химерными плазмидами с мутацией в WWE домене, препятствующей связыванию домена с ПАР.

Таким образом, нами был создан флуоресцентный сенсор, позволяющий наблюдать за образованием ПАР в живой клетке.

8.31 ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ СРЕДЫ И РАЗМЕРА МОЛЕКУЛ ДНК НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИХ ФРАГМЕНТАЦИИ УЛЬТРАЗВУКОМ

Рахматуллина А.И., Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р.

Институт биохимии и генетики Уфимского НЦ РАН, Уфа
Электронный адрес: rahmatullina.aigul1503@mail.ru

Фрагментация ДНК в водных растворах под действием ультразвука находит достаточно широкое применение в современных методах исследования генома, основанных на массивном параллелизме, например, в технологиях секвенирования нового поколения (NGS - Next Generation Sequencing) и биосенсоров как важнейший этап пробоподготовки. Несмотря на то, что ультразвуковое разрушение крупных молекул ДНК подробно изучено, данных об особенностях фрагментации ДНК-ампликонов в литературе нет. Кроме того, интригующим остается вопрос о сиквенс-специфичности фрагментации ДНК; оказалось, что наиболее часто разрывы цепей происходят по 5-CG-3' сайтам [1, 2].

Нами с помощью ПЦР были наработаны фрагменты высококопийного гена 28S рРНК богомола обыкновенного разной длины - 166, 352, 621 и 1029 п.о., что примерно соответствует 1, 2, 4 и 6 персистентным длинам ДНК. Полученные четыре ДНК-ампликона характеризовались высоким GC-составом и содержали разное количество динуклеотидов 5-CG-3'. Фрагментацию ампликонов, очищенных от ПЦР-компонентов, вели в растворах 2 М NaCl, 50% этанола и 30% формамида. Кинетические исследования показали, что ампликон длиной 166 п.о. не подвергался фрагментации даже спустя час облучения ни в одном из указанных растворов. Для ампликонов длиной 352, 621 и 1029 п.о. в целом наблюдалось увеличение скорости фрагментации с ростом длины. При этом NaCl существенно ускорял фрагментацию всех ампликонов, формамид ускорял разрушение 621 и 1029 п.о. и стабилизировал ампликон длиной 352 п.о., а наличие этанола повышало стойкость к разрушению для всех ампликонов. Полученные данные могут быть использованы при разрушении ультразвуком тотальной ДНК, когда необходимо получение пула фрагментированной ДНК заданного размера.

Литература

1. Гроховский С.Л. Специфичность расщепления ДНК ультразвуком // Мол. биол. 2006. 40. 317-325.
2. Гарафутдинов Р.Р., Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. ПЦР-анализ специфичной к последовательности ультразвуковой фрагментации ДНК // Мол. биол. 2016. 272-278.

8.32 СОЗДАНИЕ РАЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИНДИКАТОРА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМОГО СЕНСОРА NeonOxE

Ревазян А.С., Ермакова Ю.Г., Белоусов В.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: aram93-95@mail.ru

К настоящему времени для детекции пероксида водорода, выступающего в качестве сигнальной молекулы во многих клеточных процессах, были созданы различные генетически кодируемые флуоресцентные индикаторы, одним из которых является NeonOxE, относящийся к линии сенсоров НуPer.

NeonOxE - интенсифицированный сенсор для детекции пероксида водорода, который обладает высоким контрастом сигнала и низкой рН-чувствительностью, однако, для него характерен спектр зеленых флуоресцентных белков с единственным пиком возбуждения флуоресценции, что представляет определенные трудности при корректной оценке величины сигнала в живых системах. Таким образом, целью настоящей работы стало получить рациометрическую версию NeonOxE.

Производные NeonOxE были получены с помощью случайного мутагенеза. При последующем скрининге библиотек с использованием флуориметра была обнаружена рациометрическая версия NeonOxE с выраженным максимумом пика в спектре возбуждения флуоресценции при 408 нм и определена соответствующая мутация, W157C. Кроме того, были измерены спектральные характеристики полученного мутанта, включая квантовый выход и рН-чувствительность, которые оказались сопоставимы с аналогичными значениями для исходной формы NeonOxE. Мутант был также экспрессирован в эукариотических клетках линии НЕК293NT, где продемонстрировал в 4 раза менее контрастный сигнал по сравнению с исходной формой.

В дальнейшем планируется повысить контраст полученного варианта W157C. При условии устранения имеющегося недостатка, мутантная версия NeonOxE имеет все шансы стать одним из наиболее популярных индикаторов пероксида водорода из известных на сегодняшний день.

8.33 ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ИММУНОГЛОБУЛИНА А В КЛЕТКАХ СНО

Рыбченко В.С.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва
Электронный адрес: vladislavrusia@yandex.ru

За последнее десятилетие достигнут колоссальный прогресс в конструировании моноклональных антител. Однако, для увеличения специфической продуктивности клеточных линий продуцентов биофармацевтических препаратов необходимо продолжать исследования по оптимизации всех этапов получения и наработки антител

Одним из эффективных способов повышения продуктивности клеточной линии является разработка по улучшению экспрессионного вектора. Среди известных подходов оптимизации экспрессионного вектора можно назвать замену редко встречаемых кодонов мРНК, подбор оптимального промотора и терминатора, использование различных элементов для посадки рибосомы, таких как последовательность Козак или сайт внутренней посадки рибосомы (IRES) и т.д. В данной работе были получены различные варианты конструкции экспрессионного вектора, потенциально оказывающие влияние на уровень экспрессии рекомбинантного антитела (IgA1), нейтрализующего вирус гриппа А путем связывания с константным эпитопом гемагглютинина вируса гриппа А. Получено 4 типа экспрессионных векторов, с однонаправленной и разнонаправленной транскрипцией (промоторы генов направлены в противоположенные стороны), а также наличием или отсутствием интронов в нуклеотидной последовательности гена тяжелой цепи, располагающихся между экзонами, каждый из которых кодирует один из трех константных доменов. Таким образом, экспрессионные векторы отличаются наличием и отсутствием интронов в тяжелой цепи IgA1 и ориентацией тяжелых и легких цепей. В работе представлены результаты по экспрессии данных конструкторов в клетках СНО DG44(dhfr-), которые подтвердили ранее полученные данные о преимуществе ориентации "голова-хвост" и продемонстрировали большое преимущество использования конструкторов с наличием интронов в тяжелой цепи иммуноглобулина А1 для увеличения экспрессии антител.

Работа выполнена с использованием средств субсидии (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0060).

8.34 РАЗРАБОТКА АПТАМЕРНОГО ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А

Самохвалов А.В.¹, Сафенкова И.В.¹, Еремин С.А.², Жердев А.В.¹, Дзантиев Б.Б.¹

¹ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Москва

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, Москва

Электронный адрес: 03alexeyamohvalov09@gmail.com

Охратоксин А (ОТА) - низкомолекулярный (404 Да) токсичный метаболит плесневых грибов преимущественно родов *Aspergillus* и *Penicillium*. ОТА - широко распространенный контаминант таких сельскохозяйственных продуктов, как зерна пшеницы, ржи, овса, орехи, сухофрукты и винные напитки. Для его детекции преимущественно используются сложные методы - высокоэффективная жидкостная хроматография и иммуоферментный анализ. Задачей исследования являлась разработка экспрессионного метода детекции ОТА, основанного на применении в качестве рецепторных молекул аптамеров - одноцепочечных ДНК олигонуклеотидов.

В работе использовали биотинилированный 36-членный ДНК-аптамер: 5'-биотин-GAT-CGG-GTG-TGG-GTG-GCG-TAA-AGG-GAG-CAT-CGG-ACA-3' (11,7 кДа). Аптамер охарактеризовали методом спектроскопии кругового дихроизма. Подтверждено, что он образует трехмерную структуру - антипараллельный квадруплекс. Синтезирован конъюгат ОТА с 4'-(аминометил)флуоресцеином. Предложенный метод анализа основан на конкуренции между свободным (содержащимся в пробе) ОТА и определенным количеством меченого ОТА за ограниченное количество сайтов связывания аптамерного рецептора. Реакционную смесь облучали плоскополяризованным светом с $\lambda_{ex} = 480$ нм и измеряли флуоресценцию при $\lambda_{em} = 535$ нм. Степень деполяризации регистрируемой флуоресценции зависит от соотношения свободного и связанного с аптамером меченого ОТА, что позволяет определять содержание ОТА в пробе. Принципиальная особенность разработки - применение комплексов аптамера с белками для усиления деполяризации, позволившее снизить предел обнаружения в 40 раз по сравнению с анализом на основе нативного аптамера. В буферной системе ОТА достоверно выявляется в концентрациях до 3 нМ (1.2 нг/мл). Продолжительность анализа - 15 мин.

Полученные результаты демонстрируют, что при детекции низкомолекулярных соединений предложенная стратегия позволяет совместить преимущества поляризационного флуоресцентного анализа и аптамерных рецепторов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 15-53-45090-ИНД_а.

8.35 РАЗВЕТВЛЕННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 5-(ПЕРИЛЕН-3-ИЛЭТИНИЛ)УРАЦИЛ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Сапожникова К.А., Брылёв В.А., Стрешнев Ф.П., Чистов А.А., Коршун В.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: ksapozh@mail.ru

5-(Перилен-3-илэтинил)-2'-дезоксидеокси-уридин (**dUY11**) и его арабиносахаридный аналог (**aUY11**) известны как соединения, подавляющие репликацию ряда оболочечных вирусов, например, гриппа H1N1, простого герпеса типа 1, гепатита С [1], клещевого энцефалита [2]. Механизм противовирусного действия данных соединений окончательно не установлен, однако ясно, что определяющее значение имеет взаимодействие периленового остатка с липидной мембраной вириона. Для оценки влияния структуры молекулы противовирусного соединения на биологическую активность, была синтезирована 5-(перилен-3-илэтинил)урацил уксусная кислота (**cm1UY11**), аналог нуклеозида, в котором углеводный остаток заменен на карбоксиметильную группу.

Из кислоты **cm1UY11** получен ряд ее разветвленных производных, несущих один, два, три или четыре фармакофорных остатка. Эти соединения получены с помощью медь-катализируемой реакции циклоприсоединения (CuAAC; также "клик"-реакция) азидосодержащего разветвляющего "ядра" с пропаргиламидом кислоты **cm1UY11**, содержащим пивалоилоксиметильную группу (Pom) в положении 3. В качестве ядра использовались недавно полученные нами азиды на основе пентаэритрита [3]. Pom-группа используется для увеличения растворимости соединений и упрощения их очистки. Разработан метод удаления Pom-группы для целевых веществ. Предполагается, что кооперативное взаимодействие нескольких периленовых остатков с липидами сильно увеличит сродство таких соединений к мембранам. В настоящее время ведется изучение биологической активности полученных веществ.

Литература

1. M.R. St. Vincent et al. Rigid amphipathic fusion inhibitors, small molecule antiviral compounds against enveloped viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010, 107, 17339-17344.
2. A.A. Orlov et al. Rigid amphipathic nucleosides suppress reproduction of the tick-borne encephalitis virus. Med. Chem. Commun., 2016, 7, 495-499.
3. A.I. Ponomarenko et al. Tetrahedral DNA conjugates from pentaerythritol-based polyazides. Tetrahedron, 2016, 72, 2386-2391.

8.36 РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОРХИДНЫХ (*ORCHIDACEAE*) ЦЕНТРАЛЬНО-ЕВРОПЕЙСКОЙ РОССИИ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Сидоров А.В., Сечин Е.Н., Зайцева Ю.В., Маракаев О.А.

Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль
Электронный адрес: zjv9@ Rambler.ru

В настоящее время интерес к семенному размножению редких видов орхидных Центрально-европейской России многократно возрос, однако до сих пор технология асимбиотического проращивания с последующей высадкой сеянцев на нестерильные субстраты разработана для незначительной части видов. Это обусловлено невозможностью применения традиционных подходов, поскольку орхидные отличаются большим количеством особенностей. Приемы предпосевной подготовки, последующего культивирования сеянцев *in vitro* и дальнейшего выращивания необходимо отрабатывать индивидуально для каждого вида. Разработка системы биотехнологического культивирования для трех видов орхидных умеренного климата северного полушария - *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó (пальчатокоренник Фукса), *D. incarnata* (L.) Soó (п. мясокрасный), *D. maculata* (L.) Soó (п. пятнистый) включала оптимизацию предпосевной обработки семян, состава асимбиотических сред, культивирования сеянцев при разных режимах длительности и интенсивности освещения.

При посеве зрелых семян *D. fuchsii*, *D. incarnata* и *D. maculata* на модифицированную питательную среду Knudson с применением стандартных стерилизующих агентов (гипохлорит натрия, пероксид водорода, этиловый спирт) их прорастание составляло не более 40%. Предпосевная обработка семян 3%-й серной кислотой в течение 10 минут способствует прорастанию более 70% зрелых семян у всех исследуемых видов. Культивирование посевов в темноте в течение первых двух месяцев с последующим освещением приводит к формированию сравнительно мелких сеянцев с большим числом ризоидов и более раннему образованию апекса. Такие сеянцы на 14 месяц культивирования имеют ортотропный побег и придаточный корень. Сеянцы, находящиеся в темноте на протяжении первых четырех месяцев, оказываются более крупными, но с меньшим количеством ризоидов. В таких посевах более часто отмечается образование вторичных протокоормов, а число сеянцев с апексом существенно ниже.

Таким образом, для ускорения темпов роста и развития сеянцев целесообразно освещение посевов через два месяца культивирования. Дальнейшая работа в начатом направлении будет способствовать оптимизации методов культивирования орхидных Центрально-европейской России в условиях *in vitro*.

8.37 БИОГЕНЕЗ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ

Сидорова Д.Е.², Кошкарова О.А.¹, Попова А.А.¹, Плюта В.А.¹, Хмель И.А.¹

¹Институт молекулярной генетики РАН, Москва

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

Электронный адрес: misenok1@gmail.com

В последние годы внимание исследователей привлекла возможность синтеза наночастиц (НЧ) биологическим методом (или методом "зеленого синтеза") с использованием бактерий, грибов, растений и водорослей. Этот подход рассматривается как альтернатива имеющимся химическим методам получения НЧ металлов, т.к. метод биогенеза НЧ обеспечивает достаточно дешевую, экологически безопасную, удобную для коммерциализации процедуру получения НЧ металлов. Главным механизмом в процессе биогенеза с помощью экстрактов растений считается восстановление ионов благодаря активным компонентам растений, например, терпеноидам, флавононам, альдегидам, кетонам, амидам и карбоновым кислотам.

В настоящей работе была исследована способность экстрактов различных растений (ЭР) восстанавливать катионы серебра до наночастиц серебра (НЧС) и также проведено изучение НЧС, их физических свойств и бактерицидного действия. Всего было протестировано 25 экстрактов из растений, обитающих в России, из которых было отобрано 8 ЭР, способствующих наиболее эффективному образованию НЧС. Разработан метод наиболее эффективного получения НЧС с использованием ЭР, подобраны соотношения ЭР и AgNO₃, а также оптимальные условия эксперимента. Образование НЧС при увеличении времени инкубации раствора в темноте сопровождалось появлением серой, красно- или темно-коричневой окраски. Присутствие в растворе НЧС было подтверждено наличием типичного пика поглощения при 390-450 нм на спектрах поглощения, полученных на спектрофотометре Shimadzu 3600. Проведены исследования размера и морфологии НЧС методами атомно-силовой микроскопии, показано, что ЭР обуславливают образование НЧС различного размера. Некоторые образцы образуют агрегаты НЧС (больше 100 нм). Методом электронной микроскопии обнаружены различные формы полученных НЧС (палочковидные, треугольные, квадратные и т.д.).

Были также проведены эксперименты по изучению действия НЧС на бактерии при росте культур бактерий на жидкой среде NB (в пробирках при качании) и на твердой среде NB в чашках Петри. НЧС оказывали угнетающее действие на штаммы *E. coli* K-12 и *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, клетки которого были более устойчивы к НЧС. Показано, что НЧС подавляли формирование биопленок *E. coli* K-12 AB1157.

8.38 ПРОДУКТЫ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ ИЗ ХИТОЗАНОВЫХ ГЕЛЕЙ С ПОВЫШЕННОЙ МЕХАНИЧЕСКОЙ ПРОЧНОСТЬЮ

Социлина А.В.^{1,2}, Простякова А.И.², Вихров А.А.²

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

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

Электронный адрес: ddraig@yandex.ru

Несмотря на то, что гидрогели из биосовместимого биodeградируемого полисахарида хитозана используются в качестве ранозаживляющих, косметологических и других средств, более широкое применение материалов на его основе для решения различных медико-биологических задач ограничено в связи с достаточно низкой механической прочностью геля. В связи с этим разработка гелей с повышенной механической прочностью является весьма актуальной задачей.

Цель настоящего исследования заключалась в разработке материалов на основе гидрогелей хитозана с повышенной механической прочностью, пригодных, прежде всего, для реконструкции отделов опорно-двигательной системы.

В ходе работы была разработана методика получения гидрогелевых материалов из 1-2% растворов хитозана с повышенной механической прочностью (до 1,2 МПа), которая превышает значения прочности хитозановых гелей, описанных в литературе (0,016-0,4 МПа, при той же концентрации хитозана). Разработанные гидрогели характеризуются более равномерным распределением хитозана в объеме геля, при этом диаметр пор составляет менее 100 нм, согласно данным СЭМ. Свойства получаемых гелей можно регулировать не только за счёт изменения концентрации и молекулярной массы хитозана, но и за счёт введения различных наполнителей (например, поливинилового спирта, гидроксиапатита и т.п.). Также в состав сформированного геля можно вводить различные лекарственные средства, например, доксорубин. Кроме того, для получения изделий со сложным рельефом поверхности разработанная нами методика не требует использования перфорированных форм для литья, обеспечивающих контакт изделия с раствором щелочи, необходимой для формирования геля. В ходе работы были получены изделия таких форм, как трубки, капилляры, спирали, имитации менисков, фаланг пальцев руки, ушной раковины, трахеи.

Тесты с использованием клеточных линий ТНР1 и А549 показали, что все разработанные гели не оказывают негативного воздействия на рост и пролиферацию указанных клеток.

Таким образом, разработана методика, которая позволяет получать материалы на основе хитозана без использования сшивающих агентов, характеризующиеся повышенной механической прочностью и приемлемым уровнем цитотоксичности, перспективных для решения медико-биологических задач, требующих использования материалов с повышенной прочностью.

8.39 ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ НОВЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ 2-АМИНОБЕНЗИМИДАЗОЛА

Степанов М.Р.¹, Харитонов М.И.²

¹Московский технологический университет (МИТХТ), Москва

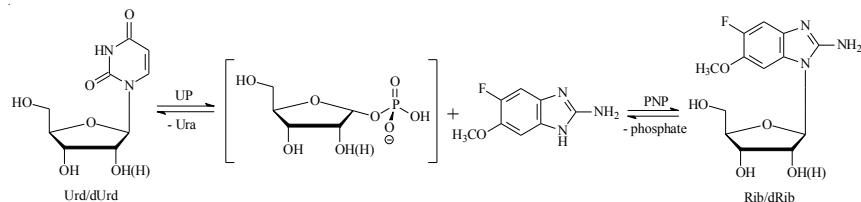
²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: stepanson2008@gmail.com

Модифицированные нуклеозиды представляют большой интерес для науки, поскольку обладают противовирусной (рибавирин, азидотимидин, видарабин) или противоопухолевой (кладрибин, флуорабин, цитарабин) активностью. Производные бензимидазола широко применяются в медицинской практике в качестве спазмолитиков, нейролептиков, противоязвенных, противотуберкулезных препаратов. Наиболее эффективным нуклеозидом на основе бензимидазола, обладающим противовирусным действием, в настоящее время является Маривавир - 2-изопропиламино-5,6-дихлоро-1-(β-L-рибофуранозил)бензимидазол.

Нами была доказана возможность получения модифицированных нуклеозидов 2-амино-бензимидазола с помощью реакции ферментативного трансгликозилирования (переноса углеводной части молекулы с природного на модифицированное гетероциклическое основание).



В реакции использовались ферменты нуклеозидфосфорилазы *E. coli*, обладающие широкой субстратной специфичностью - пуриннуклеозидфосфорилаза (PNP) и уридинфосфорилаза (UP).

Синтезированы два новых модифицированных нуклеозида бензимидазола - 2-амино-5-фтор-6-метокси-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол и 2-амино-5-фтор-6-метокси-1-(β-D-2'-дезоксирибофуранозил)бензимидазол с конверсией 82 и 56 %, соответственно. Чистота нуклеозидов составила более 98%. Нуклеозиды были получены в количествах, достаточных для дальнейшей оценки их цитотоксичности и потенциальной противовирусной активности *in vitro*.

8.40 СЕЛЕКЦИЯ ПЕРСПЕКТИВНОГО ПРОДУЦЕНТА ПАЛЬМИТОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Степанова Н.Н., Моргунов И.Г.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина

РАН, Пущино

Электронный адрес: nadinka_1994@mail.ru

Пальмитолеиновая кислота (ПОК) (цис-9-гексадеценвая кислота) относится к ω-7 группе мононенасыщенных жирных кислот (ЖК). ПОК является мощным антиоксидантом, обладает антимикробными свойствами, улучшает состояние кожи, волос и ногтей, защищает печень и другие внутренние органы от действия токсических веществ. ПОК находит широкое применение в медицине, косметологии и пищевой промышленности, а также используется для технических целей в качестве антифризной добавки к биодизельному топливу и как сырье в производстве 1-октена, применяемого для получения линейных полиэтиленов низкой плотности.

Основными природными источниками ПОК являются облепиха, орех макадамия, нутряной жир морских животных, жир норки. Однако, использование природного сырья ограничивает коммерческое получение ПОК, т.к. содержания ПОК в представленных источниках не достаточно для крупномасштабного производства, что также отражается и на стоимости продукта. Цена за ПОК (40%) на мировом рынке составляет \$320-340 за литр. К странам-производителям ПОК относятся США, Германия, Китай. В последние годы начал рассматривается вопрос о перспективности микробиологического синтеза ПОК. На данный момент подобная технология для производства ПОК в мире ещё не разработана.

Целью данной работы является поиск перспективного продуцента ПОК. В качестве удобных биотехнологических объектов рассматривались дрожжи. Исследования показали, что дрожжи значительно различаются по способности синтезировать ПОК: 5 штаммов не синтезировали ПОК, а у 12 штаммов доля ПОК в составе липидов варьировала от 2,2 до 33,5%. Максимальное содержание ПОК обнаружено у штаммов *Yarrowia lipolytica* 68 (33,5%), *Debaryomyces globosus* ВКМ Y-9539 (30,8%), *Candida boidinii* ВКМ Y-2356 (30,0%), *Y. lipolytica* 69 (23,9%). В качестве перспективного продуцента ПОК предложен штамм *D. globosus* ВКМ Y-9539, характеризующийся накоплением липидов в фазу активного роста культуры. Эта особенность позволяет сократить затраты на ферментацию, максимальное накопление липидов у *D. globosus* ВКМ Y-9539 наблюдалось уже на 6 сутки, причём доля ПОК в липидах в процессе культивирования была на относительно постоянном высоком уровне.

8.41 АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ПАНЦИРЕЙ И ИГЛ ЗЕЛЁНЫХ МОРСКИХ ЕЖЕЙ *STRONGYLOCENTROTUS DROBACHIENSIS*

Терёхина Я.А., Пожарицкая О.Н.

ЗАО Санкт-Петербургский институт фармации, Санкт-Петербург
Электронный адрес: terekhina.ya@doclinika.ru

Интерес к морским ежам обусловлен прежде всего их высокой пищевой ценностью: в икре животного содержится до 34,9% жиров и 19,2-20,3% белков. При получении съедобных гонад из морских ежей побочным продуктом являются их панцирь и иглы, которые представляют собой известковое образование. Содержание карбоната кальция в скелете морского ежа по разным данным составляет от 70 до 95%.

Целью данной работы является исследование макро- и микроэлементного состава панцирей и игл зелёного морского ежа для дальнейшего использования в качестве сырья для выделения биодоступного кальция, а также оценка возможного влияния сезона улова на химический состав скелета.

В работе представлены результаты элементного анализа панцирей и игл зелёного морских ежей *Strongylocentrotus drobachiensis*, выловленных в водах Баренцева моря летом 2015 и зимой 2016 года. Концентрацию макроэлементов в образцах определяют методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной аргонной плазмой на атомно-эмиссионном спектрометре ICAР 61Е Тhеrmo. Содержание микроэлементов измеряли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной аргонной плазмой на масс-спектрометре Agilent 7500.

Анализ образцов показал, что основным компонентом скелета морского ежа является кальций, причем его содержание в иглах изучаемого вида примерно одинаково с содержанием в панцире: содержание в иглах - 41,95±0,07%, в панцире - 39,35±0,21%. Содержание магния и серы оказалось выше в панцирях, чем в иглах: Mg - 1,58±0,01% и 0,92±0,02%, соответственно; S - 0,48±0,01% и 0,31±0,01%, соответственно. Содержание следующих макроэлементов приблизительно одинаково и приведено в иглах и панцирях соответственно: Na - 0,82±0,03% и 0,84±0,01%; P - 0,05±0,003% и 0,03±0,0004%; Sr - 0,16±0,002% и 0,21±0,001%. Также измерены массовые доли микроэлементов: Be (<0,01 мг/кг) B, Al, P, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Ag (<0,05 мг/кг), Cd, I, Ba, Tl (<0,05 мг/кг), Pb, Bi (<0,05 мг/кг), Hg (<0,025 мг/кг).

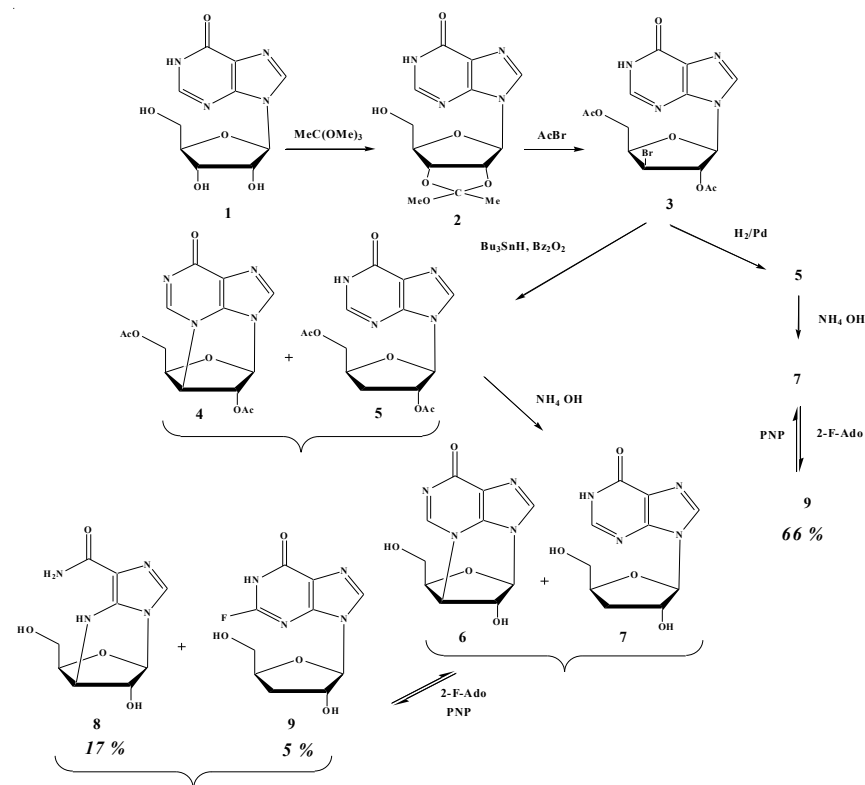
Таким образом, впервые дано описание элементного состава панцирей и игл зелёного морского ежа *Strongylocentrotus drobachiensis* Баренцева моря и на основе полученных данных сделан вывод о том, что панцири и иглы морского ежа можно использовать в качестве источника для выделения биодоступного кальция. Также нами установлено, что сезон улова не влияет на химический элементный состав скелета исследуемого животного.

8.42 УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПОБОЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНОМ СИНТЕЗЕ 2-ФТОР-КОРДИЦЕПИНА И РАЗРАБОТКА ВАРИАНТА СПОСОБА ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

Токунова Ю.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: julia.tok@mail.ru

Цель работы - установление структуры побочных соединений в химико-ферментативном синтезе нуклеозида 2-фтор-кордицепина (9) и разработка варианта способа его получения.



где: 2-F-Ado - 2-фтораденозин; PNP - пурииннуклеозидфосфорилаза *E. coli*.

Обнаружено, что при восстановлении соединения (3) Cu_3SnH в присутствии Vz_2O_2 помимо основного продукта (5) образуется циклический нуклеозид (4). После удаления ацетильных групп в целевом соединении (7) присутствует 17% примеси (6). На следующей стадии транскликозилирования образуется смесь соединений (8) и (9), причем выход целевого продукта очень низкий. Показано, что при каталитическом гидрировании бром-производного (3) побочный продукт (4) не образуется. 2-Фтор-кордицепин (9) синтезируется с выходом 66 %.

8.43 РАЗРАБОТКА НОВЫХ БИОПРЕПАРАТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩЕЙ И МИКОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЯМИ

Фунтикова Т.В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
РАН, Пушкино

Электронный адрес: dujmo@mail.ru

Современной тенденцией в области экологической биотехнологии является поиск микроорганизмов, одновременно обладающими несколькими полезными свойствами. Принципиальная возможность совмещения углеводородокисляющей и микостатической активности у одного штамма бактерий показана для представителей рода *Pseudomonas*. Однако исследований возможности использования таких микроорганизмов для рекультивации загрязненных почв в настоящее время крайне мало.

В работе из нефтезагрязненных почв, отобранных с территории ЯНАО России и Казахстана, было выделено 46 штаммов-нефтедеструкторов. Все исследуемые микроорганизмы способны к утилизации n-алканов, моно- и полициклических ароматических углеводородов (бензол, этилбензол, фенол, толуол, нафталин, фенантрен). Наиболее эффективные штаммы, перспективные для разработки биопрепаратов, были идентифицированы как бактерии родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. Исследуемые штаммы деградировали углеводороды нефти в широком температурном (4-37°C) и pH-диапазоне (4-9), устойчивы к солям (до 7%), продуцируют биоПАВ. Исследован генетический контроль биодеградации ПАУ и n-алканов. На основании фракционного анализа и определения степени деструкции нефти индивидуальными штаммами было составлено 4 ассоциации микроорганизмов - эффективных деструкторов углеводородов нефти. С использованием капиллярной газожидкостной хроматографии была проведена количественная оценка остаточного содержания 13 различных ПАУ и n-алканов в образцах, полученных после деградации высоких концентраций нефти (15%) исследуемыми микробными ассоциациями. Наиболее эффективная ассоциация (*Rhodococcus* sp. Ф2/1-Н4, *Rhodococcus erythropolis* Ф2/2-Н4 и *Pseudomonas putida* BS3701) деградировала 48% исследуемых n-алканов и 38,9% ПАУ по сравнению с контролем (среда с нефтью без микроорганизмов) и обладала антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным грибам родов *Fusarium*, *Rhizoctonia* и *Gaeumannomyces*. Нанесение этих штаммов на газон микромицетов вызывало появление зон ингибирования. Таким образом, разработанная ассоциация обладает одновременно нефтеокисляющей и микостатической активностями.

Работа выполнена при поддержке гранта "У.М.Н.И.К." № 0007076.

8.44 ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСТРАКТА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАЛАНХОЭ (*KALANCHOE PINNATA*), ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ИСКУССТВЕННЫЙ ГЕН АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ЦЕКРОПИНА P1

Фурс О.В., Захарченко Н.С., Пиголева С.В., Шевчук Т.В., Дьяченко О.В., Бурьянов Я.И.

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино
Электронный адрес: olya.furs.86@mail.ru

Каланхоэ - лекарственное растение, сок (экстракт) которого используют для лечения кожных ран, ожогов, язв и как биостимулятор для пересадки кожи. В соке каланхоэ содержатся витамины, биологически активные флавоноиды, дубильные вещества, полисахариды и антиоксиданты. Экспрессия в растениях генов гетерологичных антимикробных пептидов (АМП) повышает их лечебные и бактерицидные свойства. У полученных нами ранее трансгенных растений каланхоэ перистого (*Kalanchoe pinnata* L.), синтезирующих ген антимикробного пептида цекропина P1, показана повышенная устойчивость к фитопатогенам, патогенам человека и окислительному стрессу.

В настоящей работе исследовали физиолого-биохимические свойства экстрактов трансгенных растений каланхоэ, экспрессирующих ген антимикробного пептида цекропина P1. Разработан способ выделения экстракта из растений каланхоэ. Методом масс-спектропии MALDI и вестерн-блот анализом подтверждено наличие цекропина P1 в экстракте и соответствие его молекулярной массе 3338 Да. Показано, что антибиотические свойства экстракта, обусловленные наличием цекропина P1, сохраняются при выдерживании его при повышенной температуре (100°C в течение 2 часов). Определено, что оптимальным консервантом для экстракта каланхоэ является 0,5% хлороформ. При использовании 0,5% хлороформа срок хранения экстракта при температуре 40°C составлял 6 месяцев (эквивалентного его хранению при комнатной температуре в течение 2 лет). Экстракт трансгенных растений каланхоэ обладал биостимулирующими свойствами: добавленный в культуральную среду для растений, он индуцировал морфогенез каллусов растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) и хрустальной травки (*Mesembryanthemum crystallinum*). Полученные результаты указывают на повышенные биологически-активные свойства сока растений каланхоэ, экспрессирующих ген цекропина P1, и перспективность его использования в фармакологии и медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 15-08-02050.

8.45 СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОКЛАСТЕРОВ СЕРЕБРА, КОНЬЮГИРОВАННЫХ С БЕЛКОМ

Шайбакова И.Д., Лазарев В.Н., Баринов Н.А., Клинов Д.В.

ФНКЦ ФХМ ФМБА, лаборатория медицинских нанотехнологий, Москва
Электронный адрес: ilyanashaybakova@gmail.com

Флуоресцентные нанокластеры, полученные восстановлением солей благородных металлов включают в себя от нескольких до сотен атомов Au, Pt, Ag. За счет своих размеров нанокластеры проявляют свойства, похожие на свойства молекул. Так, для них характерны дискретные энергетические уровни. Как и в органических флуорофорах, электронные переходы между энергетическими уровнями приводят к поглощению и испусканию света (флуоресценции). Было показано, что металлические нанокластеры стабильнее органических флуорофоров к выгоранию. Эти уникальные для металлических частиц оптические свойства предполагают возможное использование нанокластеров в качестве биосенсоров и биомаркеров.

Цель работы: оптимизация синтеза флуоресцентных серебряных нанокластеров, изучение их физико-химических и цитотоксических свойств.

Оптические свойства нанокластеров были изучены методом флуориметрии - при возбуждении светом с длинами волн от 400 до 480 нм серебряные нанокластеры флуоресцируют в красной области (с максимумом эмиссии при 640 нм).

Было изучено влияние pH на оптические свойства нанокластеров - щелочные значения pH оказались оптимальными для получения стабильных, интенсивно флуоресцирующих нанокластеров, квантовый выход которых составляет ~1%.

Методом кругового дихроизма показана частичная денатурация белков, конъюгированных с нанокластерами серебра. Атомно-силовая микроскопия подтвердила разнообразие конформаций: как глобул, так и фибрилл. Также при помощи атомно-силовой микроскопии был определен размер получившихся нанокластеров - от 2 до 3 нм.

Анализ токсичности белков для культуры клеток Hela с использованием набора флуоресцентных красителей "Life/dead" (Thermo Fisher Scientific, Великобритания) показал, что нанокластеры не проникают в монослойные культуры клеток и, следовательно, нетоксичны по отношению к эукариотическим клеткам.

Таким образом, были оптимизированы условия эксперимента для получения частиц с наибольшим квантовым выходом. Они не агрегируют при хранении при комнатной температуре на протяжении 2 месяцев и сохраняют свои флуоресцентные свойства; не токсичны по отношению к эукариотическим клеткам. Разработанный протокол потенциально применим для других белков и благородных металлов (например, Pt).

8.46 ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СРАВНЕНИЕ ERBb2-СПЕЦИФИЧНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ miniSOG

Шилова О.Н., Прошкина Г.М., Деев С.М.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: olga.shilova.n@gmail.com

Одним из перспективных направлений терапии рака является создание адресных фотосенсибилизаторов, селективно связывающихся с опухолевыми клетками. Наличие адресного модуля позволяет снизить количество вводимого агента и уменьшить побочные эффекты, связанные с фотосенсибилизацией кожи.

В данной работе исследованы свойства двух белковых адресных фотосенсибилизаторов на основе модуля miniSOG - генно-инженерного производного LOV-домена фототропина 2 *Arabidopsis thaliana*. В качестве нацеливающих модулей использовали одноцепочечное антитело 4D5scFv и неиммуноглобулиновый модуль DARPIn₉₋₂₉, созданный на основе анкириновых повторов. Оба адресных модуля специфичны к мембранному рецептору ERBb2 (HER2), повышенная экспрессия которого характерна для многих опухолей молочной железы, яичника, желудка и поджелудочной железы. Адресный и токсический модули объединяли на уровне генетической конструкции, рекомбинантные белки экспрессировали в бактериях *E. coli* штамма BL21(DE3).

В качестве интегрального показателя эффективности фототоксина использовали IC₅₀ - концентрацию белка в опыте, при которой сохраняется жизнеспособность 50% опухолевых клеток. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи спектрофотометрического МТТ-теста. Для 4D5-miniSOG IC₅₀ составила 0,16 мкМ, для DARPIn-miniSOG - 0,8 мкМ.

Дальнейшее исследование свойств полученных белков показало, что наибольшее влияние на эффективность токсина оказывает скорость их интернализации, определяющая степень повреждения мембраны клетки при облучении. K_d комплексов фототоксинов и ERBb2, определенные методом поверхностного плазмонного резонанса, оказались сопоставимыми и составили 10 нМ для 4D5-miniSOG/ERBb2 и 5 нМ для DARPIn-miniSOG/ERBb2. Скорость интернализации комплексов фототоксин/ERBb2 оценивали методом проточной цитометрии. Известно, что в кислой среде эндосомы модуль miniSOG теряет свои функциональные свойства: способность флуоресцировать и способность генерировать активные формы кислорода. Двукратное снижение уровня флуоресценции клеток SK-BR-3, обработанных DARPIn-miniSOG, происходило за 10 минут, а клеток SK-BR-3, обработанных 4D5-miniSOG, - за 30 минут, что указывает на более медленную интернализацию комплексов ERBb2/4D5-miniSOG.

В процессе медленной интернализации у фототоксического модуля miniSOG возникает большая вероятность вызвать окисление липидов плазматической мембраны под действием облучения. Именно скоростью интернализации объясняются различия в цитотоксичности 4D5-miniSOG и DARPIn-miniSOG в отношении ERBb2-положительных клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-24-00106.

8.47 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ФОРМЫ ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ THERMUS THERMOPHILUS

Яречук А.С., Степаненко В.Н., Константинова И.Д., Тюрин О.В., Смирнова О.С.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: anna173yaren4uk@mail.ru

Последнее время в современной "красной" биотехнологии часто возникает необходимость использования биологических катализаторов, что вносит существенный вклад в полную себестоимость АФС. Так, например, для получения таких препаратов как Флударабин; Неларабин; Кладрибин, Рибавирин применяются бактериальные нуклеозидфосфорилазы, в том числе пурииннуклеозидфосфорилаза *Thermus thermophilus*, оптимум ферментативной активности которой лежит в интервале 50 - 60°C. Проведение химико-ферментативных реакций в данном температурном интервале позволяет использовать более высокие концентрации субстратов и уменьшает риски перекрестной контаминации.

Стандартным технологическим решением, иногда позволяющим снизить издержки, является использование иммобилизованных ферментов. Однако, коммерчески доступные полимерные носители дороги, а количество фермента, связанного с носителем, невелико. Альтернативным решением является использование связанных агрегатов ферментов (CLEA). Основными преимуществами такого подхода являются: отсутствие необходимости использования дорогостоящих полимерных носителей, высокая объемная концентрация фермента, простота и низкая себестоимость получения.

Цель настоящей работы: разработка технологии получения пурииннуклеозидфосфорилазы *Thermus thermophilus* в форме CLEA и исследование возможности ее многократного использования в реакции трангликозилирования. Для чего нами был создан штамм-продуцент рекомбинантной пурииннуклеозидфосфорилазы *Thermus thermophilus E. coli BL21(DE3)/pAYR*. Разработана простая и эффективная схема её выделения, включающая в себя дезинтеграцию биомассы, тепловую денатурацию собственных белков продуцента, высаливание целевого белка сульфатом аммония с последующей очисткой посредством анионообменной хроматографии. Полученный ферментативный препарат использован для получения CLEA. В качестве сшивающего агента нами был использован глутаровый альдегид.

Исследования субстратной специфичности пурииннуклеозидфосфорилазы *Thermus thermophilus* в форме CLEA подтвердили ее способность катализировать реакцию фосфорилиза инозина и в то же время показали, что тимидин и дезоксиуридин не являются для нее субстратами.

СЕКЦИЯ 9 БИМЕДИЦИНСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1 ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОРФИРАЗИНОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫХ СТРУКТУР ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Бармин Р.А.¹, Неганова М.Е.², Тараканов П.А.², Мищенко Д.В.^{3,4}

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

²Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка

³Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка

⁴Научно-образовательный центр Московского государственного областного университета, Черноголовка

Электронный адрес: barmin.rn@gmail.com

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является наиболее интенсивно развивающимся методом среди органосохраняющего лечения онкозаболеваний. Актуальной проблемой в настоящее время является оптимизация метода ФДТ. Одним из наиболее известных в клинической практике порфиразиновых фотосенсибилизаторов (ФС) для ФДТ является фталоцианин цинка PсZn, однако он обладает высокой гидрофобностью, в связи с чем приготовление истинных водных растворов данного ФС не представляется возможным.

Для создания потенциальной лекарственной формы были разработаны методы получения водорастворимых фармакоформ, как на основе липосом, так и на основе неионогенных ПАВ. Для фталоцианина цинка был обнаружен сдвиг максимума поглощения с 670 нм в длинноволновую область спектра 740 нм для липосомальной формы, для смешанной формы - 820 нм. Установлено, что фотосенсибилизаторы на основе искаженной структуры 1,4-дiazепинового гетероцикла превосходят PсZn в формировании фотохимически активных агрегатов J-типа.

В экспериментах *in vitro* отмечена интенсификация пероксидного окисления липидов с ростом концентрации ФС и дозы облучения, что свидетельствует об увеличении концентрации $1O_2$, либо O_2^{*-} . Обнаружен дозозависимый эффект увеличения фотоокислительной активности в зависимости от дозы облучения и концентрации ФС. Наиболее эффективной оказалась липосомальная форма PсZn, что обусловлено наличием фотоактивных J агрегатов. На модели опухолевой клеточной линии MCF-7 показана зависимость фототоксических свойств 1,4-дiazепинопорфиразинов от способности к агрегации, квантового выхода генерации синглетного кислорода и металла-комплексобразователя. Обнаружено, что фототоксичность исследуемых ФС зависит от вклада в структуры лиганда. *In vivo* показано, что изучаемые ФС могут быть отнесены к классу малотоксичных соединений. Способность изученных порфиразинов образовывать стабильные комплексы с тяжелыми металлами может открыть возможность взаимодействия с радиоактивным излучением.

9.2 БЕЛКИ ЧЕЛОВЕКА SLURP-1 И SLURP-2 - ПРИРОДНЫЕ ЗАЩИТНИКИ ОТ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕТОК

Бычков М.Л., Ефременко А.В., Бойко А.А., Шаронов Г.В., Шулепко М.А.,
Феофанов А.В., Люкманова Е.Н., Долгих Д.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

SLURP-1 и SLURP-2 (secreted Ly-6/uPAR-related protein-1 и 2) - это трехпептидные белки человека из семейства Ly6, регулирующие рост и дифференцировку эпителиальных клеток. Ранее нашей группой было установлено, что SLURP-1 является аллостерическим антагонистом $\alpha 7$ никотиновых рецепторов ацетилхолина, а SLURP-2 взаимодействует с широким спектром никотиновых и мускариновых рецепторов ацетилхолина. SLURP-1 и SLURP-2 ингибируют рост кератиноцитов посредством взаимодействия с никотиновыми рецепторами, состоящими из $\alpha 7$ субъединиц. Так как активация $\alpha 7$ nAChR часто стимулирует рост опухолевых клеток, в том числе под действием никотина, препараты SLURP-1 и SLURP-2 могут рассматриваться как перспективные препараты для борьбы с опухолями различного происхождения.

В этой работе нами показано, что SLURP-1 и SLURP-2 сокращают пролиферацию клеток опухолевых линий различного происхождения. Так, рост клеток карциномы груди SKBR-3 тормозился на 25% и 30% при 24- и 48-часовой инкубации с препаратами SLURP в концентрации 0,1 нМ, соответственно. Аналогично, пролиферация клеток аденокарциномы груди MCF-7 сокращалась на 30% и 40% при 24- и 48-часовой инкубации, соответственно. Тот факт, что сокращение пролиферации клеток при 24- и 48-часовой инкубации с препаратом SLURP отличается слабо, свидетельствует о пролонгированном противоопухолевом эффекте SLURP на этих клетках. Препараты SLURP-1 и SLURP-2 также значительно уменьшают рост клеток меланомы A431. Таким образом, препараты рекомбинантных SLURP-1 и SLURP-2 являются перспективными противоопухолевыми средствами.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 14-14-00255) и РФФИ (грант № 16-04-01697).

9.3 КОМПОЗИЦИОННЫЕ КОВАЛЕНТНО СШИТЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Водякова М.А.^{1,2}, Балабанова Т.В.^{1,2}, Дроздова М.Г.², Маслова М.В.³, Касаткина М.А.³, Демина Т.С.⁴, Успенский С.А.⁴, Кильдеева Н.Р.³, Марквичева Е.А.²

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

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

³Московский государственный университет дизайна и технологии, Москва

⁴Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва

Электронный адрес: marishkalava@mail.ru

Создание биосовместимых, биodeградируемых полимерных матриц, обеспечивающих адгезию, рост и пролиферацию клеток, является одной из главных задач тканевой инженерии. В данной работе для получения полимерных матриц использовали природные биоразлагаемые полисахариды хитозан (Хит) и гиалуроновую кислоту (ГК). Выбор материалов определялся тем, что Хит обладает антибактериальной и биоадгезивной активностями, а ГК является основным внеклеточным компонентом соединительной ткани и участвует в процессах роста, пролиферации и дифференцировки. Для получения механически стабильных композиционных Хит-ГК гидрогелей (матриц) проводили сшивку макромолекул Хит.

Цель работы - получение ковалентно сшитых композиционных гидрогелей на основе Хит и ГК, исследование их структуры и свойств, а также изучение их способности поддерживать рост клеток *in vitro*. Гидрогели получали на основе Хит (ММ 320 кДа) и ГК (ММ 5 и 30 кДа), при этом ГК вводили в состав матрикса двумя способами: до или после сшивки Хит. Для введения ГК до сшивки растворы Хит и ГК смешивали (массовое соотношение Хит/ГК = 5:1) и сшивали в течение 24 ч. При этом макромолекулы ГК распределялись в объеме гидрогеля. Для введения ГК после сшивки ковалентно сшитый гидрогель Хит инкубировали в растворе ГК (2 масс. %) в течение 2 ч, при этом макромолекулы ГК распределялись преимущественно по поверхности гидрогеля. Структуру полученных матриц изучали с помощью сканирующей электронной и конфокальной лазерной микроскопии. Культивирование мышечных фибробластов (L929) в матриксах проводили в среде DMEM (10% FBS) в течение 7 дней. Распределение, адгезию, а также рост клеток в матриксах оценивали качественно с помощью конфокальной микроскопии, а количество жизнеспособных клеток определяли методом МТТ-теста. Было показано, что количество жизнеспособных клеток зависело от метода введения ГК и было выше для всех образцов, полученных введением ГК в объем гидрогеля. При этом максимальное количество жизнеспособных клеток получили для матриц, содержащих ГК с ММ 5 кДа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-07669 А).

9.4 ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК ЧЕЛОВЕКА В СИСТЕМЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *EX VIVO*

Воробьева Д.А.¹, Лебедева А.М.¹, Вагида М.С.¹, Иванова О.И.¹, Фелькер Е.И.¹, Гонтаренко В.Н.², Шнектор А.В.¹, Марголис Л.Б.³, Васильева Е.Ю.¹

¹Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва

²Институт хирургии им. А.В. Вишневского Минздрава России, Москва

³Национальный институт детского здоровья и развития человека им. Юнис Кеннеди Шрайвер Национальных институтов здоровья, Мэриленд, США

Электронный адрес: vorobyeva-daria2015@yandex.ru

В настоящее время множество работ указывает на значительную роль воспаления в атерогенезе, однако исследование иммунологических механизмов атерогенеза затруднено отсутствием экспериментальной модели, в которой бы воспроизводилось микроокружение атеросклеротической бляшки человека. Ранее мы разработали методику культивирования атеросклеротических бляшек, при которой жизнеспособность и структура ткани сохраняются в течение 20-22 дней. Поскольку атеросклеротическая бляшка представляет собой сложное иммунное образование, необходимым является сохранение иммунных клеток в тканевой культуре.

Целью настоящей работы было исследование динамики лимфоцитарного состава атеросклеротической бляшки в разработанной нами ранее системе *ex vivo*. Атеросклеротические бляшки, полученные в результате операции каротидной эндартерэктомии, мы разрезали на кольцевидные блоки и культивировали на коллагеновых губках. В 0, 4 и 19 дни культивирования мы анализировали лимфоцитарный состав эксплантов с помощью проточной цитометрии. Мы показали, что на 4 и 19 дни культивирования в ткани сохраняются CD4⁺CD8⁻ и CD4⁺CD8⁺ Т клетки, В клетки и CD16⁺ естественные киллеры. При этом на 4 день наблюдалось значимое увеличение содержания CD4⁺CD8⁺ Т клеток (p<0.05). Кроме того, мы исследовали изменение количества IL-2 и IFN-γ-продуцирующих Т клеток от начала и до 4 дня культивирования. Через 4 дня культивирования в эксплантах бляшек сохранялись CD8⁺ и CD8⁻ IFN-γ-продуцирующие Т клетки, однако наблюдалась тенденция к снижению количества IFN-γ- и IL-2-продуцирующих Т клеток (p=0.068).

Таким образом, мы показали, что разработанная нами ранее *ex vivo* модель атеросклеротической бляшки человека позволяет сохранять жизнеспособность различных популяций лимфоцитов в течение более чем 2 недель, а также что в *ex vivo* культуре возможно сохранение Т клеток, способных осуществлять Th1 ответ.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации (договор № 14.В25.31.0016) и гранта РФФИ (договор № 16-04-01716).

9.5 ПОЛУЧЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ АПКОНВЕРТИРУЮЩИХ НАНОФОСФОРОВ

Демина П.А.^{1,2}, Хайдуков Е.В.³, Шолина Н.В.⁴, Рочева В.В.³,
Хоченков Д.А.⁴, Нечаев А.В.², Генералова А.Н.^{1,3}

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

²Московский технологический университет (Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва)

³Институт фотонных технологий "Кристаллография и фотоника" РАН, Москва

⁴Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва

Электронный адрес: polidemina1207@yandex.ru

Визуализация, диагностика и терапия раковых опухолей является одной из важных задач, стоящих перед современной медициной. Наноразмерные антистоксовы фосфоры (НАФ), состоящие из матрицы NaYF_4 , допированной ионами редкоземельных металлов, таких как Er^{3+} , Yb^{3+} , Tm^{3+} , флуоресцируют в УФ- и видимой областях спектра при возбуждении ближним ИК-излучением и являются перспективными метками для биомедицинских исследований. Эти частицы характеризуются узким пиком эмиссии, большим стоксовым сдвигом, химической и физической стабильностью, а также низкой токсичностью. Однако для применения их в качестве биометок в *in vivo* исследованиях необходимо гидрофилизовать поверхность частиц с целью создания коллоидно-стабильных, биосовместимых и не вызывающих иммунного ответа организма реагентов.

В данной работе были разработаны способы модификации поверхности НАФ полисиаловой кислотой (ПСА). Она примечательна тем, что не проявляет токсичность и не является иммуногенной. НАФ, предварительно гидрофилизированные с использованием полиэтиленimina, модифицировали ПСА двумя способами: 1) путем формирования ковалентной связи между полимером-модификатором и ПСА с использованием метода карбодиимидной активации; 2) адсорбцией ПСА на поверхность НАФ за счет электростатических взаимодействий. Исследованы химические и фотофизические свойства полученных НАФ. Эксперименты на лабораторных животных (мышьях) при внутривенном введении НАФ и детекции результатов при облучении светом с длиной волны 975 нм показали, что время циркуляции НАФ-ПСА в кровеносной системе превосходит время циркуляции НАФ-ПЭГ и составляет 3 часа. Эти результаты демонстрируют перспективность использования НАФ-ПСА для визуализации солидных опухолей.

9.6 МЕТОД ОДНОСТАДИЙНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ОБРАЗЦОВ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ДЛЯ ПЦР-АНАЛИЗА

Зыбин Д.И.¹, Простякова А.И.², Ищенко А.А.¹, Капустин Д.В.²

¹Московский технологический университет (Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва)

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

Электронный адрес: mithtchem@gmail.com

Работа посвящена разработке метода экспресс-выделения и очистки ДНК из сложных биологических смесей. Большинство известных методов выделения ДНК многостадийны, трудоемки и часто сопровождаются потерями выделяемого компонента. С нашей точки зрения более привлекательной представляется одностадийная схема выделения целевого компонента смеси, при которой выделяемый биополимер после нанесения смеси на специальный сорбент, не удерживаясь, выходит в составе исключенного объема, а примеси удерживаются сорбентом.

Основной задачей исследования являлась разработка универсального одностадийного метода выделения ДНК из образцов сложного состава. В качестве объектов исследования использовали образцы растений и почвы. Указанные образцы, как известно, содержат мощные ингибиторы полимеразы - хлорофиллы и гуминовые кислоты, соответственно. Поэтому разработка метода экспресс-выделения ДНК из таких образцов с использованием сорбционных материалов, обеспечивающих возможность одностадийного выделения ДНК, является актуальной задачей.

В ходе работы была разработана оптимизированная схема лизиса с последующим выделением и очисткой продукта картриджным методом на ФП-ПАНИ-сорбенте (разработанный в лаборатории "Полимеры для биологии" ИБХ РАН кремнеземный сорбент, последовательно модифицированный нанослоями фторопласта и полианилина). Суммарное время, затрачиваемое на процесс выделения, не превышало 25-30 минут. Содержание ДНК в собранных элюатах подтверждали с помощью УФ-спектроскопии и электрофореза в 0.8% агарозном геле. Полученные элюаты анализировали методом ПЦР в режиме реального времени. Показано, что разработанный метод выделения и очистки ДНК с применением картриджного метода на ФП-ПАНИ-сорбенте из образцов сложного состава и различного происхождения (растительные объекты, почва) является более эффективным по ряду показателей (выход ДНК, степень очистки ДНК от белков, количество стадий, время проведения пробоподготовки) по сравнению с используемыми в настоящее время многостадийными методами.

9.7 ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ЧЕЛОВЕКА

Иванова М.А., Кошкин С.А., Толкунова Е.Н.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
Электронный адрес: ima-8911329780@mail.ru

По данным ВОЗ, колоректальный рак занимает 4 место в общей статистике онкологических заболеваний. Ряд исследований показал, что в опухоли существует минорная популяция клеток, которые характеризуются наличием способности к самоподдержанию, пролиферации, повышенной резистентности к цитостатическим агентам. Эти клетки были названы раковыми стволовыми клетками (РСК). Считается, что недостаток кислорода в солидных опухолях является важным фактором поддержания этих уникальных свойств РСК.

Цель исследования: изучить чувствительность РСК первичной клеточной культуры аденокарциномы толстой кишки человека к цитостатическому агенту - 5-фторурацилу (5-ФУ) в условиях гипоксии.

Для получения первичных клеточных культур колоректального рака человека использовали опухолевый материал, полученный при резекции аденокарциномы толстой кишки. Культивирование проводилось в среде DMEM/F12 с 10% FBS. Далее полученные клетки трансдуцировали вирусной репортерной конструкцией SOREX6x и проводили селекцию устойчивых клонов на среде с пуромицином. Методом ОТ-ПЦР оценили экспрессию эндогенных стволовых факторов Nanog, Oct4, Sox2. Имитировали условия гипоксии добавлением в культуральную среду CoCl₂, затем в течение двух суток вели культивирование при обработке 5-ФУ, измеряли жизнеспособность клеток методом МТТ.

Были получены две первичные клеточные культуры колоректального рака (БСК1 и БСК6), отобраны клоны клеток, экспрессирующих эндогенные стволовые факторы Nanog, Oct4, Sox2. Клоны линии БСК6 характеризовались повышенной устойчивостью к воздействию 5-ФУ, в условиях гипоксии резистентность возрастала. Лекарственная устойчивость клонов линии БСК1 не отличалась от исходной клеточной культуры. Такой результат, вероятно, связан с различиями в свойствах исходных образцов.

9.8 ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ПРОЛИН-БОГАТЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

Калашиников А.А., Болосов И.А., Баландин С.В., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: alarm14@gmail.com

Среди множества молекулярных факторов системы врождённого иммунитета животных особый интерес представляет класс линейных антимикробных пептидов (АМП), обогащённых остатками пролина. Подавляющее большинство известных на сегодняшний день пролин-богатых АМП животных выделены из тканей насекомых и млекопитающих. Пролин-богатые АМП способны действовать на молекулярные мишени внутри бактериальной клетки, не нарушая целостности цитоплазматической мембраны.

Целью данной работы являлось изучение и сравнение биологических свойств антимикробных пептидов mini-ChVac7.5N α из нейтрофилов козы *Capra hircus* и апидаецина 1b из гемолимфы медоносной пчелы *Apis mellifera*. Апидаецин 1b состоит из 18 аминокислотных остатков и обладает умеренной антимикробной активностью, которая зависит от ионной силы среды. Пептид mini-ChVac7.5N α состоит из 22 аминокислотных остатков и обладает высокой антимикробной активностью, которая также зависит от ионной силы среды. Исследуемые АМП были получены методом гетерологической экспрессии в бактериальной системе. Для каждого АМП были определены значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) в отношении штамма *E. coli* BL21(DE3) Star. Для оценки влияния антимикробных пептидов на процесс бактериальной трансляции была использована бесклеточная реоксинтезирующая система на основе экстракта *E. coli* BL21(DE3) Star. Реакционную смесь инкубировали с различными концентрациями АМП и определяли уровень экспрессии EGFP на основе данных о его флуоресценции.

Исследования функциональной активности mini-ChVac7.5N α и апидаецина 1b показали, что оба пептида способны в равной степени эффективно ингибировать бактериальную трансляцию. Наблюдаемые различия в значениях МИК mini-ChVac7.5N α и апидаецина 1b можно объяснить тем, что антибактериальная активность пролин-богатых пептидов зависит не только от способности ингибировать внутриклеточные процессы, но и от эффективности транслокации этих соединений через мембрану микроорганизмов.

9.9 РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЭЖХ-ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

Козлов И.А.¹, Ищенко А.А.¹, Капустин Д.В.²

¹Московский технологический университет (Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва)

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

Электронный адрес: ivkozlov911@gmail.com

Работа посвящена разработке ВЭЖХ-метода определения ингибиторов ДНК-полимеразы в биологических образцах (лизаты, элюаты). Эта задача представляется актуальной, поскольку большинство известных методов выделения ДНК для проведения ПЦР-анализа многостадийны и часто сопровождаются потерями выделяемого компонента в процессе пробоподготовки, в то время как не всегда удается в должной мере очистить выделяемую нуклеиновую кислоту от ингибирующих ПЦР примесей. С нашей точки зрения, метод ВЭЖХ позволяет количественно и относительно быстро определять все компоненты исследуемой смеси, и, следовательно, делать обоснованное заключение об эффективности того или иного протокола пробоподготовки и используемых при этом сорбционных материалов.

Основной задачей исследования являлась разработка универсального метода определения ингибиторов ДНК-полимеразы, присутствующих в биологических образцах сложного состава. В качестве объектов исследования использовали образцы крови, растений и почвы. Указанные образцы, как известно, содержат мощные ингибиторы полимеразы - гемоглобин, хлорофиллы и гуминовые кислоты, соответственно. Поэтому разработка метода определения ингибиторов ДНК-полимеразы в элюатах, получаемых из таких образцов, является актуальной задачей.

В ходе работы была разработана методика определения ингибиторов ДНК-полимеразы. Подобраны необходимые условия для проведения анализа, причем, затрачиваемое на анализ время не превышало 35-40 минут. Хроматограммы, полученные на ВЭЖХ-системе Perkin Elmer S200 с имеющимся UV/vis и рефрактометрическим детекторами, хорошо соотносятся с данными спектрофотометрических, электрофоретических методов и результатами ПЦР-анализа. Показано, что разработанный метод определения ингибиторов ДНК-полимеразы в образцах сложного состава и различного происхождения (кровь, ткани растений, почва) является полезным инструментом молекулярной диагностики при оценке эффективности различных методов пробоподготовки при проведении ПЦР-анализа.

9.10 СИНТЕЗ НОВОГО ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОГО ПРОИЗВОДНОГО ИНГИБИТОРА ОБРАТНОГО ЗАХВАТА ДОФАМИНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИМИ КЛЕТКАМИ

Лаврова А.В.¹, Акимов М.Г.², Мингазов Э.Р.³, Грецкая Н.М.²

¹Московский технологический университет (Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва)

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

³Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Электронный адрес: alinalavrova1@gmail.com

Трансмембранный белок-транспортер дофамина (DAT) регулирует передачу дофаминергического сигнала путём обратного захвата дофамина. В терапии нейродегенеративных заболеваний используют ингибиторы обратного захвата дофамина, среди которых наиболее селективным к DAT по сравнению с серотониновым (SERT) и норадреналиновым (NET) транспортерами является ингибитор GBR12909 (ваноксерин). Структура ваноксерина может служить основой для разработки новых функционализированных аналогов GBR12909.

Цель работы - создание базовой структуры на основе ингибитора GBR12909, содержащей линкер с аминогруппой, для дальнейшего присоединения фармакофоров и флуорофоров.

По ранее разработанной стратегии был синтезирован аналог GBR12909, содержащий в своей структуре линкер на основе 6-аминогексановой кислоты. Полученное соединение использовали для синтеза флуоресцентного аналога GBR12909, содержащего BODIPY-C3-кислоту в качестве флуорофора. Исследование захвата флуоресцентного аналога GBR12909 клетками феохромоцитомы PC12 показало, что синтезированное соединение накапливается в клетках по механизму, чувствительному к ингибированию ваноксеринем.

Показана также интернализация флуоресцентного аналога GBR12909 первичной культурой дофаминергических нейронов чёрной субстанции мыши. Специфическое накопление флуоресцентного аналога дофаминергическими нейронами подтверждено в эксперименте с двойным мечением дофаминергических нейронов флуоресцентным аналогом GBR12909 и флуоресцентными антителами к тирозингидроксилазе, которая является маркером катехолсодержащих нейронов. Таким образом, показано, что синтезированное флуоресцентное производное GBR12909 является функциональным аналогом ваноксерина.

9.11 ПОЛИСАХАРИДНЫЕ МИКРОКОНТЕЙНЕРЫ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ ДОСТАВКИ ПРОТИВОРАКОВЫХ ЛЕКАРСТВ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ В МОДЕЛИ *IN VITRO*

Лысова Е.Ю.^{1,2}, Гилёва А.М.¹, Акасов Р.А.^{1,2}, Букреева Т.В.^{2,3},
Бородина Т.Н.², Марквичева Е.А.¹

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

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН, Москва

³НИЦ "Курчатовский институт", Москва
Электронный адрес: lysovaelena93@mail.ru

Известно, что многие противоопухолевые препараты имеют липофильную природу, что существенно затрудняет их медицинское применение. Таким образом, поиск и разработка новых носителей для доставки гидрофобных лекарств является одной из наиболее актуальных задач современной биомедицины.

Ранее в нашей лаборатории была разработана методика получения полисахаридных микроконтейнеров (ПМ) на основе хитозана и ксантановой камеди [1]. Было показано, что в такие ПМ можно эффективно инкапсулировать липофильные препараты. Однако в связи с тем, что хитозан не имеет фармакологической статьи, было принято решение о замене его на ДЕАЕ-декстраны. В результате была проведена успешная оптимизация существующей методики. Универсальная и простая схема синтеза позволяет вносить дополнительные модификации даже в готовые ПМ. Так, модификация поверхности ПМ различными полимерами позволяет увеличить стабильность частиц, оптимизировать заряд на поверхности ПМ или создать систему активной направленной доставки различных лекарств.

Целью работы является получение новых ПМ с функционализированной поверхностью и их исследование в модели *in vitro*. Контейнеры со средним диаметром 350 нм были получены с использованием ДЕАЕ-декстрана (150 кДа, Sigma-Aldrich) и ксантановой камеди (20-300 сР, Sigma-Aldrich) с помощью низкочастотного ультразвука. В первом случае полученные ПМ покрывались полилизинном (40-60 кДа, Sigma-Aldrich), во втором - полиэтиленгликолем (1,5 кДа, Sigma-Aldrich). В качестве модельного противоопухолевого препарата в ПМ инкапсулировали тимохинон (100 мг/мл). Исследование полученных ПМ проводили на клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Цитотоксичность носителей была определена с помощью МТТ-теста. Накопление и распределение ПМ внутри клеток было изучено с помощью проточной цитометрии и конфокальной микроскопии.

Литература

1. Borodina T. et al., Preparation of multifunctional polysaccharide microcontainers for lipophilic bioactive agents // ACS Appl. Mater. Interfaces, 2014;6(9):6570-8.

9.12 УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ PON3 В ПЛАЦЕНТАРНОЙ ТКАНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Обухова Е.А.¹, Боровков И.М.¹, Дамулин В.И.¹, Боровкова Е.И.⁴,
Антипова Н.В.^{2,3}

¹Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

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

³Российский университет дружбы народов, Москва

⁴РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва

Электронный адрес: liza_obukhova@mail.ru, nadine.antipova@gmail.com

Введение. Семейство параоксоназ включает три представителя: PON1, PON2 и PON3. Все три фермента обладают антиоксидантными свойствами и проявляют лактоназную активность, и поэтому они играют важнейшую роль в развитии многих патологических состояний. Из всех трех представителей PON3 наименее изучен, однако уже доказано его антиоксидантное, противовоспалительное и антимикробное действие. Известно, что фермент PON3 локализуется на мембранах митохондрий и защищает клетки от апоптоза. Впервые способность PON3 проявлять липолактоназную активность и гидролизовать N-ацил-гомосерин лактоны (АГЛ) - сигнальные молекулы кворум-зависимых систем грамотрицательных бактерий, была описана учеными Басслером и Гринбергом (Вашингтон) около 10 лет назад, что положило начало изучению роли PON3 в патогенезе инфекционных заболеваний.

Цель. Определить уровень экспрессии PON3 в плацентарной ткани в норме и при хронических инфекционных заболеваниях.

Материалы и методы. Для проведения рандомизированного исследования было сформировано две группы: основная (n=9, из них 1 с HCV инфекцией, 8 с хроническим пиелонефритом) и группа сравнения (n=4). Все плаценты были получены от пациенток после операции кесарево сечение в сроках 38-39 недель беременности. В качестве экспериментальных препаратов брали фрагменты размером 1x1 см из центральной части плацент. Из образцов выделяли РНК тризолом, затем определяли уровень экспрессии PON3 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (RTQ-PCR).

Результаты исследования. Выявлено повышение уровня экспрессии PON3 в плацентах пациенток, страдающих хроническими инфекционными заболеваниями, относительно контрольной группы.

Выводы. Полученные данные подтверждают, что фермент PON3 играет важную роль в обеспечении противовоспалительного и противомикробного ответа организма.

9.13 *IN VIVO* МОДЕЛЬ ОСТРОГО ПЕРОРАЛЬНОГО АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНОГО ОТРАВЛЕНИЯ

Паликов В.А.^{1,2}, Паликова Ю.А.^{1,2}, Белоус Г.И.^{1,2}, Смирнов И.В.³,
Дьяченко И.А.^{1,2}, Мурашев А.Н.^{1,2}

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино

²Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино

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

Электронный адрес: viktorpalikov@mail.ru

На данный момент широко распространены фосфорорганические пестициды, которые успешно используются против вредителей сельскохозяйственных культур. Обладая высокой эффективностью, они в то же время высоко токсичны для человека и животных. Отравление фосфорорганическими веществами и в наши дни является самым тяжело протекающим патологическим процессом, приводящим к летальному исходу.

Биомоделирование острого отравления, возникающего после однократного воздействия высоких доз на организм, может возникать в результате аварии на предприятиях, специализирующихся по производству фосфорорганических веществ.

В нашей биомодели в качестве ФОС был использован параоксон. Чтобы максимально снизить фоновую активность эндогенной карбоксилэстеразы у мышей линии Balb/c, был использован ингибитор крезилбензодиафосфоринксид (CBDP) в дозе 1,5 мг/кг, который полностью подавлял действие данного фермента.

Для исследования были взяты три группы мышей, которым подкожно вводился ингибитор карбоксилэстеразы в дозе 1,5 мг/кг, а через 20 минут перорально был введен параоксон в дозах 6; 6,5 и 7 мг/кг. В каждой группе было по 10 животных.

В дозе 6 мг/кг все мыши выжили, но имели сильные клинические проявления в виде тремора и затрудненного дыхания. В дозе 6,5 мг/кг погибло 50% животных, а доза 7 мг/кг оказалась летальной.

Таким образом, нами получена адекватная биомодель отравления ФОС, которая учитывает "эстеразный статус" мыши относительно человека и соответствует часто встречаемому пути отравления.

9.14 ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛИПЕПТИДНОГО АНАЛЬГЕТИКА, СЕЛЕКТИВНО ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩЕГО С ПУРИНЕРГИЧЕСКИМИ РЕЦЕПТОРАМИ

Паликова Ю.А.^{1,2}, Паликов В.А.^{1,2}, Белоус Г.И.^{1,2}, Андреев Я.А.³,
Дьяченко И.А.^{1,2}, Мурашев А.Н.^{1,2}

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино

²Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино

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

Электронный адрес: ulia2791@ Rambler.ru

Восприятие боли - важная способность организма, позволяющая избежать раздражителей и минимизировать наносимый ему вред. Независимо от причин возникновения, многие острые и хронические заболевания сопровождаются болью и воспалением, резко снижающими качество жизни человека. Воспаление - это комплексный патологический процесс, возникающий в ответ на повреждение клеточных структур организма или действие патогенного раздражителя, и проявляющийся в реакциях, направленных на устранение продуктов повреждения. Именно воспалительный синдром является одной из основных причин обращения людей за врачебной помощью. Недавнее открытие и описание семейства рецепторов TRPV-1 и TRPA-1 выявило ряд потенциальных новых терапевтических мишеней для лечения хронической боли. Аллилизотионинат (АЛТС) является агонистом TRPA-1 канала, тем самым способствуя развитию острой и воспалительной боли. Способность воздействовать на TRPA-1 каналы дает возможность моделировать острую и воспалительную боль, и на основе этой биомодели изучать активность новых препаратов.

Целью работы является изучение анальгетической активности пептида MS1 на мышах ICR. Животным из экспериментальной группы вводили пептид MS1 в дозах 0,03 и 0,3 мг/кг внутривенно, контрольной группе - физиологический раствор. Через 30 минут животным субплантарно в заднюю лапу вводили 0,5% раствор АЛТС, после чего в течение 5 минут фиксировалось количество облизываний задней лапы и время её поджатия.

Результаты. При внутривенном способе введения по результатам теста в дозе 0,3 мг/кг были отмечены достоверные отличия между экспериментальной и контрольной группами. В дозе пептида 0,03 мг/кг достоверных отличий отмечено не было. Таким образом, проведено исследование анальгетической активности MS1 в тесте гиперчувствительности, спровоцированной АЛТС при внутривенном введении MS1 в разных дозировках. Показана значительная анальгетическая активность пептида.

9.15 ВЫЯСНЕНИЕ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ, ОПОСРЕДУЮЩИХ РАЗВИТИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНСУЛИНУ, В МОДЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЭНДОТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

Палкина К.А.

НИИ экспериментальной кардиологии, Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава РФ
Электронный адрес: palkina_1993@mail.ru

Сахарный диабет второго типа (СД2Т) и ассоциированные с ним сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) представляют огромный интерес для современной медицины. Инсулиновая резистентность (ИР) - начальный этап СД2Т. ИР характеризуется нарушениями ответной реакции клеток инсулин-зависимых тканей на стимуляцию инсулином, в первую очередь, неспособностью инсулина регулировать захват глюкозы из крови. Механизм возникновения ИР точно не изучен.

К развитию ССЗ приводят нарушения, затрагивающее сосудистое русло, а именно эндотелий кровеносных сосудов. Помимо участия в захвате глюкозы, эндотелий является основным регулятором тонуса сосудов, артериального давления и обладает чувствительностью к инсулину. Таким образом, изучение регуляции инсулин-зависимого сигнального каскада в клетках эндотелия может оказать положительное влияние на исследование причин ССЗ, связанных с метаболическими расстройствами. Таким образом, целью нашей работы было выяснение сигнальных каскадов, опосредующих развитие ИР в клетках модельного эндотелия человека.

Для проведения анализа наиболее удобной является гибридная культура EA.hy926, имеющая ярко выраженный эндотелиальный фенотип. ИР стимулировали по стандартной методике, инкубируя клетки с повышенной концентрацией D-глюкозы, человеческого инсулина и пальмитата, конъюгированного с БСА. Анализ полученных лизатов проводили с использованием метода Вестерн-блот, с использованием общих и фосфоспецифических антител к компонентам инсулин-зависимого сигнального каскада киназе АКТ (Ser473) и эндотелиальной NO-синтазе eNOS (Ser1177). Продукцию NO измеряли с помощью высокоспецифического флуоресцентного красителя - 4-амино-5-метиламино-2,7-дифлюоресцеин диацетата (ДАФ). Для оценки проницаемости монослоя, образованного клетками EA.hy926, применяли методику динамического измерения импеданса клеток.

Нам удалось установить, что продукция NO клетками эндотелия увеличивалась в ответ на стимуляцию инсулином. Кроме того, проницаемость монослоя эндотелия в условиях гипергликемии и гиперинсулинемии не изменяется, но увеличивается в условиях гиперлипидемии. Согласно полученным результатам, гипергликемия не влияет на способность инсулина стимулировать фосфорилирование Ser-473 в АКТ. Однако в условиях гиперинсулинемии и гиперлипидемии базальный уровень фосфорилирования остатка Ser-473 АКТ и Ser-1177 eNOS повышается, что свидетельствует о гиперактивации инсулин-зависимого сигнального каскада.

9.16 ВЛИЯНИЕ ФИТОПРЕПАРАТОВ НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В АДИПОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ

Панова А.В., Черноруцкий М.В.

Тверской государственной медицинской университет, Тверь
Электронный адрес: paanlip@mail.ru

Гомеопатические средства и БАДЫ с фитоэстрогенами сегодня являются популярными препаратами для лечения различных патологий. Однако, если с их эффектами в области гинекологии все относительно понятно, то их влияние на адипогенную дифференцировку клеток-предшественников адипоцитов до сих пор не изучено. В то же время, проблема нежелательного набора веса весьма актуальна для большинства пациентов.

Наиболее интересным для изучения влияния фитоэстрогенов на адипогенез нам показался многокомпонентный гомеопатический препарат Мастодинон.

Первичную культуру мезенхимальных стромальных клеток получали путем трипсинизации жировой ткани самок крыс. Клетки 3-го пассажа засеивали в шестилуночные культуральные планшеты из расчёта $4 \cdot 10^5$ клеток в лунку, ожидали рост до достижения конfluence, после чего индуцировали клетки по классической схеме (инсулин+дексаметазон) и экспериментальным схемам (в присутствии и отсутствии эстрадиола; при различных концентрациях Мастодинона). Затем производилась окраска ОРО для достижения визуализации адипоцитов и сравнения степени окрашивания в различных лунках.

Через 14 дней культивирования контрольная лунка (без индукторов адипогенеза) не содержала адипоцитов, а в лунке, где клетки индуцировались по рутинной методике, наблюдалось образование жировых клеток. В остальных лунках, содержащих либо эстрадиол, либо Мастодинон, адипогенная дифференцировка протекала весьма активно.

Для исследования дозозависимости в лунки вносили Мастодинон в различных концентрациях (3 мкл/мл; 0,3 мкл/мл; 0,03 мкл/мл среды), однако скорость адипогенной дифференцировки существенно не отличалась.

В ходе работы было выявлено, что эстрадиол усиливает адипогенез в индуцированных клетках и способствует спонтанной адипогенной индукции неиндуцированных клеток. Влияние фитоэстрогенов на адипогенную дифференцировку клеток-предшественников заключается в выраженной индукции адипогенеза, скорость которого не зависит от концентрации фитоэстрогенов.

Отсюда следует, что при назначении фитоэстрогеновых препаратов пациентам следует учитывать их адипогенный эффект.

9.17 ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ НАДФН-ОКСИДАЗ ПРИ АДИПОЦИТАРНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ

Подкуйченко Н.В., Воротников А.В., Стафеев Ю.С.

Институт экспериментальной кардиологии, Российский кардиологический исследовательский центр, Москва

Электронный адрес: nra.fox@gmail.com

Инсулиновая резистентность (ИР) является самым ранним проявлением при диабете 2-го типа. Она определяется как неспособность инсулина снижать уровень глюкозы в крови после принятия пищи. На клеточном уровне это связано с невозможностью инсулина стимулировать усвоение глюкозы в скелетных мышцах, печени и жировых клетках. На молекулярном уровне это связано с нарушением внутриклеточных каскадов, запускаемых инсулиновым рецептором в этих клетках. Физиологические условия, которые приводят к ИР, включают ожирение, воспаление, хроническую гипоксию, окислительный и клеточный стрессы. Однако точные механизмы, ведущие к нарушению сигнализации инсулином, остаются во многом неясными. НАДФН-оксидазы, которые генерируют активные формы кислорода (АФК), как полагают, вносят свой вклад в развитие ИР через механизм окислительного/клеточного стресса. АФК, как известно, модулируют активность рецепторов инсулина, PI3-киназы и MAP-киназы нисходящих каскадов. Чтобы проверить участие НАДФН-оксидаз в ИР, мы стремимся подавить их экспрессию в культивируемых мышечных адипоцитах 3T3-L1 и исследовать влияние на инсулин-зависимый сигнальный каскад. В качестве предварительного исследования мы показали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (PCR-RT), какие НАДФН-оксидазы экспрессируются в клетках 3T3-L1 и как изменяется их экспрессия в процессе дифференцировки. Преадипоциты 3T3L1 были дифференцированы до зрелых адипоцитов в течение 10 дней по стандартному протоколу с использованием высокой концентрации глюкозы, инсулина, изобутилметилксантила (IBMX), дексаметазона и розиглитазона, как индукторов адипогенеза. мРНК выделяли с помощью набора RNeasy® до, после и в середине (4-й день) дифференцировки. RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit был использован для получения кДНК. Экспрессию НАДФН-оксидаз определяли методом PCR-RT с использованием специфических праймеров и выделенной кДНК в качестве матрицы. Мы обнаружили, что экспрессия основных НАДФН-оксидаз (NOX4, DUOX1, DUOX2) значительно снижалась в этих клетках во время адипогенеза. Western blotting образцов с антителами на NOX4 и DUOX2 подтвердил данные PCR-RT и показал, что экспрессия НАДФН-оксидаз почти прекращается в зрелых адипоцитах. Эти результаты свидетельствуют о том, что НАДФН-оксидазы являются маркерами и могут поддерживать недифференцированный фенотип преадипоцитов. Дальнейшие исследования с подавлением экспрессии покажут, могут ли они повлиять на адипогенез и восприимчивость к ИР в этих клетках.

9.18 ИЗУЧЕНИЕ ЛИТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА *LYSOBACTER CAPSICI* ВКМБ-2533

Протас К.Г., Васильева Н.В.

Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

Электронный адрес: k.protas2015@gmail.com

Одной из главных проблем медицинской микробиологии является появление антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов. Формирование новых механизмов резистентности у бактерий приводит к тому, что они становятся нечувствительны к известным на сегодняшний день антибиотикам. Серьёзной проблемой является и развитие фунгицидорезистентности. Широкое внедрение в практику системных фунгицидов привело к появлению резистентных грибных возбудителей.

Род *Lysobacter* известен продукцией ряда антибиотиков, литических ферментов и коротких пептидов, обладающих антифунгальной и антимикробной активностями. Причем многие из биологически активных соединений, продуцируемых *Lysobacter* spp., ещё не исследованы. В связи с этим поиск и выделение литических агентов рода *Lysobacter* является перспективным направлением микробиологии и медицины.

В данной работе изучался литический потенциал *L. capsici* ВКМБ-2533. Было установлено, что этот штамм продуцирует в культуральную жидкость биологически активные соединения. Литическое действие препарата культуральной жидкости *L. capsici* было исследовано методом спот-теста на живых условно-патогенных штаммах грамположительных и грамотрицательных бактерий и мицелиарных грибах. Литический эффект был обнаружен по отношению к грамположительным бактериям *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium flavum*, *Bacillus cereus* и грибам *Fusarium sporotrichiella*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*. Установлены оптимальные условия роста культур и продукции литических агентов. Для выявления вероятных агентов белковой природы проведён сравнительный электрофоретический анализ белков полученных культуральных жидкостей. Проведенный комплекс работ позволил выявить оптимальную питательную среду для культивирования *L. capsici* и продукции литических агентов с целью дальнейшей разработки методов их выделения.

9.19 ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАФИК КАТИОННЫХ И АНИОННЫХ ЛИПОСОМ

Рябухина Е.В.¹, Ярославов А.А.², Сыбачин А.В.², Свищевская Е.В.³

¹Российский химико-технологический университет им. Менделеева, факультет нефтегазохимии и полимерных материалов, Москва

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

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

Электронный адрес: miss.katringet@yandex.ru

Использование систем доставки терапевтических препаратов позволяет повысить эффективность лекарств и вакцин и снизить побочные эффекты. Одним из вариантов таких систем являются липосомы. Нами ранее показано, что полисахаридные наночастицы, имеющие различный заряд, по-разному взаимодействуют с клетками. В частности, положительно заряженные наночастицы сорбируются на мембранах клеток, тогда как отрицательно заряженные быстро проходят внутрь. Трафик анионных липосом хорошо изучен. Данных по транспорту катионных липосом значительно меньше, и они противоречивы. Целью данной работы было изучение транспорта *in vitro* анионных (АЛ) и катионных (КЛ) липосом.

АЛ получали методом ультразвукового диспергирования. Включение родамина В осуществляли на стадии синтеза липосом. Для получения КЛ того же состава проводили перезарядку АЛ с помощью поли-N-этил-4-винилпиридиний бромида. Заряд липосом оценивали методом лазерного микроэлектрофореза. Размер и целостность липосом в водно-солевых средах исследовали с помощью динамического светорассеяния. Токсичность определяли с помощью МТТ-теста. Трафик липосом оценивали в динамике в 2D и 3D культурах клеток Colo-357 и HaCaT методом конфокальной микроскопии с использованием внутриклеточных трекеров органелл.

АЛ имели размер 16 нм, заряд $-0,77$ ((мкм/с)/(В/см)). После перезарядки КЛ имели размер 121 нм, заряд $+1,31$ ((мкм/с)/(В/см)). Методом МТТ показали токсичность КЛ (до 40%), но не АЛ (<5%), что соответствует данным по токсичности углеводных наночастиц. При инкубации в течение 4 ч все липосомы находились на мембранах клеток. При инкубации 24 и 72 ч АК проходили внутрь клеток и локализовались преимущественно в лизосомах и эндоплазматическом ретикулуме. До 90% КЛ локализовалось на мембранах клеток в 2D культурах или на поверхности сфероидов в 3D культурах, что также соответствует ранее полученным нами данным с использованием наночастиц хитозана. Таким образом, заряд определяет поведение как углеводных, так и липидных систем доставки.

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 14-13-00255).

9.20 СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СИСТЕМ ДОСТАВКИ РЕПОРТЕРНОЙ ПЛАЗМИДЫ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Санков В.А.^{1,2}, Коновалова М.В.³, Гречихина М.В.¹, Есипов Р.С.¹, Свищевская Е.В.¹

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биотехнологический факультет, Москва

³Институт биоинженерии ФИЦ биотехнологии РАН, Москва

Электронный адрес: vsankov@icloud.com

Иммунизация ДНК-содержащими векторами позволяет решать ряд проблем таких, как индукция клеточного иммунного ответа, для которого требуется внутриклеточная экспрессия белка; коррекция дегенеративных заболеваний; формирование противоопухолевого ответа и другие. В культуре клеток *in vitro* эффективны преимущественно катионные липидные системы доставки, такие как Lipofectamine, Metafectene Pro, ScreenFect и другие [1]. Однако для введения в организм требуется большое количество реагента для трансфекции, что делает терапию дорогой. Хитозан и его производные являются перспективными кандидатами для доставки ДНК.

Целью данной работы было исследование эффективности доставки репортерной плазмиды pRFP, кодирующей красный флуоресцентный белок RFP, в клетки *in vitro* и *in vivo*. Предварительные эксперименты показали, что немодифицированный хитозан не проходит в клетки *in vitro*. Единственным исключением, попадающим в клетки, является кватернизированный хитозан со степенью замещения 98%, растворимый при нейтральных pH (CQ). Однако CQ является токсичным для клеток. Нами получено гидрофобное производное за счет введения гексаноильной группы (CHQ), которое проникает в клетки и является нетоксичным.

Клетки линии эмбриональной почки человека HEK293 трансфицировали *in vitro* плазмидной ДНК pRFP с помощью CHQ в соотношении N:P (молярное соотношение остатков аминокислот катионного полимера к фосфатным группам ДНК) 50:1. В качестве положительного контроля, использовали липидный агент Metafectene Pro. Анализ эффективности доставки *in vivo* осуществляли введением подкожно, внутримышечно и внутрь опухоли плазмиды мышам линии BALB/c с перевитой опухолью СТ26. Ткани забирали через 24 ч после введения, фиксировали параформальдегидом и готовили гистологические срезы. Анализ образцов осуществлялся по экспрессии гена RFP с использованием конфокальной микроскопии.

Показали, что Metafectene Pro эффективно доставлял pRFP в клетки HEK293 *in vitro* (эффективность около 80%). При этом трансфекция с помощью CHQ была неэффективной (<5%). Несмотря на отсутствие эффекта *in vitro*, с помощью CHQ и Metafectene Pro провели трансфекцию *in vivo*. В качестве еще одного контроля использовали pRFP без системы доставки. Показали, что *in vivo* наблюдается достоверная экспрессия RFP во всех трех случаях.

Экспрессия убывала в ряду опухоль>подкожное введение>мышцы. Эффективность Metafectene Pro и CHQ была сравнимой и достоверно выше, чем после введения плазмидной ДНК без системы доставки. Таким образом, при введении плазмиды *in vivo* эффективность трансфекции выше, чем в условиях *in vitro*, что предполагает участие каких-то иных механизмов доставки ДНК в клетку. Использование производных хитозана для введения ДНК в организм открывает возможность разработки дешевых и безопасных систем доставки.

Литература

1. Gebremedhin S. et al. Gene delivery to carcinoma cells via novel non-viral vectors: Nanoparticle tracking analysis and suicide gene therapy. Eur. J. of Ph. Sciences 60 72-79.

9.21 ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ДОФАМИНАМИДА БЕКСАРОТЕНА ДЛЯ ЛИНИИ КЛЕТОК КРЫСИНОЙ ГЛИОМЫ С6

Силкина Н.И., Акимов М.Г., Грецкая Н.М., Безуглов В.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: oenothera2012@gmail.com

Глиобластома является наиболее агрессивным типом опухолей головного мозга; она приводит к летальному исходу в течение года, и хорошие препараты для ее лечения отсутствуют. Бексаротен - известный цитотоксический агент, лиганд рецептора RXR - обладает незначительной активностью в отношении глиом. Мы предположили, что конъюгация бексаротена с дофамином может сделать его структурно похожим на другой класс цитотоксических липидов - N-ацилдофамины и за счет этого увеличить его способность индуцировать гибель клеток глиомы. Целью работы было оценить наличие и механизм цитотоксичности дофаминамида бексаротена. В качестве модели глиобластомы использовали линию крысиной глиомы С6.

Клетки культивировали в условиях, рекомендованных АТСС. Для анализа цитотоксичности использовали культуру с плотностью 60000 клеток в лунке на день эксперимента. Растворы веществ в диапазоне концентраций 0.1-100 мкМ готовили в DMSO, разбавляли средой культивирования и добавляли к клеткам (финальная концентрация DMSO 0.5 об.%) на 24 часа. Выживаемость клеток оценивали с помощью МТТ-теста.

Цитотоксичность свободного бексаротена для культуры клеток С6 была низкой с долей умерших клеток при концентрации вещества 100 мкМ 35±5%. Для веществ сравнения, выбранных по критерию максимальной близости химических дескрипторов, - пальмитоилдофамина и олеоилдофамина - LC50 составляли 50±5 и 44±4 мкМ, соответственно. После конъюгации с дофамином цитотоксичность бексаротена существенно возросла до LC50=31±3 мкМ. Для выяснения механизма действия гибридного соединения были использованы ингибиторы рецептора ацилдофаминов GPR55 и рецепторов ретиноидов RXR и RAR после проверки наличия в используемой линии клеток мРНК данных белков.

Таким образом, добавление остатка дофамина к молекуле бексаротена существенно усиливает его цитотоксичность в отношении глиомы.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 16-04-00729а.

9.22 СИНТЕЗ НОВЫХ ОМЕГА-ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ НЕЙРОЛИПИНОВ

Солдатова Я.А.¹, Акимов М.Г.², Грецакая Н.М.²

¹Московский технологический университет (Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва)

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: yaroslavnaalexandrovna@gmail.com

Нейролипиды являются сигнальными молекулами со свойствами нейротрансмиттеров и нейрорегуляторов. Синтетические аналоги нейролипидов на основе омега-гидроксильированных жирных кислот позволяют создавать функционализированные нейролипиды, используя дистальный конец жирной кислоты, не затрагивая группировки, значимые для выполнения биологической функции.

Цель данной работы - синтез новых аналогов ацилдофаминов и ацилсеротонинов на основе 12-гидроксидодекановой кислоты, функционализированных флуоресцентными и фармакофорными группировками.

В ходе работы синтезированы аналоги насыщенных N-ацилдофаминов и N-ацилсеротонинов с гидроксильной группой на омега-конце, аналоги, содержащие на дистальном конце молекулы флуоресцентную BODIPY-группу, а также гибридные аналоги пальмитоилдофамина, функционализированные NO-донорной группировкой и бексаротеном - активатором RXR. Для их синтеза использовали 12-гидроксидодекановую кислоту (12-HDA) или нитро-эфир 12-гидроксидодекановой кислоты, к карбоксильной группе которых сначала присоединяли дофамин или серотонин по методу смешанных ангидридов. Дофамин и серотонин перед началом реакции превращали в их сильные производные с N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамидом (BSTFA) в присутствии пиридина. Эфиры бексаротена с 12-гидроксидодеканойлдофамином и флуоресцентной BODIPY-C3 кислоты с 12-гидроксидодеканойлдофамином или 12-гидрокси-додеканойлсеротонином получали в реакции с диизопропилкарбодиимидом в присутствии диметил-аминопиридина.

На линии крысиной феохромоцитомы PC12 был показан специфический и неспецифический транспорт синтезированного BODIPY-C3-O-C12-DA. Максимальное накопление в цитоплазме клеток составляет порядка 16.5 ± 0.7 фмоль/30,000 клеток с $t_{1/2}$ для специфического накопления 11 мин (при 37°C), для неспецифического 45 мин (при 10°C). Синтезированные гибридные аналоги проявляли выраженные цитотоксические свойства по отношению к линиям раковых клеток.

9.23 ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ И ПОЛИПЕПТИДОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ ПРОТИВОРАКОВЫХ АГЕНТОВ В КЛЕТКИ

Хованкина А.В.^{1,4}, Трушина Д.Б.^{2,3}, Акасов Р.А.¹, Букреева Т.В.^{2,3}, Марквичева Е.А.¹

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

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН, Москва

³НИЦ "Курчатовский институт", Москва

⁴Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий, Москва

Электронный адрес: khovankina@gmail.com

Доставка противораковых препаратов в клетки является приоритетной задачей биомедицины. Для ее осуществления используются различные носители, такие как липосомы, мицеллы, капсулы из различных биодеградируемых полимеров. Цель исследования - получить полимерные субмикронные капсулы, способные доставлять противораковые препараты, и изучить их цитотоксичность в моделях *in vitro*.

Многослойные капсулы, получаемые последовательной адсорбцией противоположно заряженных полиэлектролитов на коллоидные неорганические частицы, представляют собой многофункциональную систему доставки различных лекарственных веществ. Одной из важных характеристик капсул является диаметр, который определяет возможный способ их введения в организм и эффективность терапии, в частности востребованы носители субмикронного размера. С помощью комбинации методов послойной адсорбции и последующего термоиндуцированного сжатия (которое позволяет уменьшить диаметр капсул практически в два раза), были получены капсулы со средним диаметром 280 ± 90 нм, оболочка которых состоит из комплекса полисахарид/полипептид. Полученные биоразлагаемые капсулы содержали три слоя (декстран сульфат/поли-L-аргинин), и были нагружены противораковым агентом доксорубицином. Инкубация при высокой температуре (90°C) позволяет не только уменьшить размер капсул, но и стерилизовать образец. Показано, что капсулы по степени стерильности сопоставимы с образцом после автоклавирования. Это является существенным преимуществом перед другими системами доставки, поскольку позволяет использовать их для введения *in vivo* без дополнительной обработки. Цитотоксичность капсул с доксорубицином была изучена на некоторых клеточных линиях, включая линию MCF-7 аденокарциномы молочной железы человека, посредством МТТ-теста. Изменение морфологии клеток и локализацию капсул в клетках изучали с помощью оптической и лазерной конфокальной микроскопии, а исследование эффективности проникновения капсул в клетки и их накопления проводили методом цитофлуориметрии. Разработанные капсулы являются перспективной системой доставки.

9.24 РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ ГЛИКИРОВАННЫХ БЕЛКОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МАКРОФАГОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Чекина А.А., Вихнина М.В., Соболева А., Гришина Т.В., Смоликова Г.Н., Фролов А.А., Медведев С.С., Романовская Е.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
Электронный адрес: apfelsineanna@gmail.com

На данный момент проведено множество исследований, направленных на изучение молекулярных механизмов влияния гликированных белков животного происхождения на экспрессию провоспалительных генов, в то время как вопрос влияния неферментативно гликозилированных растительных белков на функциональное состояние клетки остаётся открытым. Основной задачей проводимого исследования является разработка модели, позволяющей провести оценку уровня воспалительного ответа в культуре макрофагов при их обработке гликированными белками. В качестве источника растительных гликированных белков были выбраны семена гороха *Pisum sativum L.* с желтыми и зелеными семядолями, различающимися по содержанию хлорофиллов. Для изучения провоспалительного действия гликированных белков была разработана модель воспалительного ответа на макрофагальной культуре RAW 264.7. В качестве агента, приводящего к моделированию воспалительной реакции в культуре клеток, был использован липополисахарид бактериального происхождения (ЛПС). В ходе работы была произведена оценка уровня воспалительного ответа в культуре клеток макрофагов RAW 264.7 при помощи количественного анализа содержания субъединицы р65 транскрипционного фактора NF-κB в ядре после обработки ЛПС. Культура клеток стимулировалась различными концентрациями ЛПС в течение 15 мин и 1 часа, после чего из контрольных и обработанных ЛПС клеток выделялся ядерный экстракт. Далее ядерные белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Оценка содержания NF-κB проводилась с помощью вестерн-блота с использованием поликлональных антител к субъединице р65 транскрипционного фактора NF-κB. Для тестирования модели будет проведен количественный анализ содержания NF-κB в ядре клеток макрофагов в зависимости от различных концентраций гликированного бычьего сывороточного альбумина (БСА). В дальнейшем планируется изучение влияния белков, экстрагированных из семян *P. sativum L.* с различным содержанием хлорофиллов, на функциональное состояние макрофагов линии RAW 264.7.

9.25 СИНТЕЗ И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕНУКЛЕОЗИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПЕРИЛЕНА

Чистов А.А.¹, Малков А.А.^{1,2}, Стрешинев Ф.П.^{1,2}, Коршунов В.А.¹

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

²Московский физико-технический институт (государственный университет)
Электронный адрес: dobr14@yandex.ru

5-(Перилен-3-илэтинил)-2'-дезоксидеокси-уридин (dUY11) и его арабиносахаридный аналог (aUY11) являются высокоактивными ингибиторами репликации ряда оболочечных вирусов, например, простого герпеса, H1N1, гепатита С и клещевого энцефалита [1]. В данных соединениях объёмный периленовый заместитель присоединяется к урацилу с помощью жёсткого этинильного линкера, гидрофильная часть молекулы представляет собой сахарный остаток на N-1 позиции урацила. Предполагается, что замена углеводного остатка на более простой фрагмент значительно упростит синтез, а полученные производные смогут проявлять аналогичную противовирусную активность, но будут иметь лучшие фармакокинетические свойства, такие как растворимость и биодоступность.

Для оценки необходимости углеводного остатка в молекуле противовирусного соединения была синтезирована 5-(перилен-3-илэтинил)-урацилуксусная кислота. Модификация положения N3 урацила с помощью алкилирования позволяет получить более растворимые производные. Дальнейшая модификация карбоксильной группы даёт возможность варьировать гидрофильную часть молекулы. Мы получили ряд амидов, позволяющих сравнить противовирусную активность ненуклеозидных производных перилена с соединениями dUY11 и aUY11. Полученные результаты показали, что противовирусная активность полученных соединений оказалась не хуже, чем у соединений-предшественников.

Таким образом, показано, что жесткая ароматическая часть молекулы критична для высокой биологической активности, а углеводная часть в ранее исследованном соединении dUY11 может быть с успехом заменена на карбоксиметильную группу или ее производные. Располагая набором различных по структуре соединений, в конечном счете возможно подобрать несколько оптимальных производных для дальнейших противовирусных испытаний *in vivo*.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 15-15-00053.

Литература

1. St. Vincent M.R. et al. Rigid amphipathic fusion inhibitors, small molecule antiviral compounds against enveloped viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107 (40), 17339-17344 (2010).

9.26 СИСТЕМА ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ЭЛИМИНИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА miniSOG, АКТИВИРУЕМОГО БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ РЕЗОНАНСНЫМ ПЕРЕНОСОМ ЭНЕРГИИ

Шрамова Е.И., Прошкина Г.М., Деев С.М.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: shramova.e.i@gmail.com

Фотодинамическая терапия (ФДТ) злокачественных новообразований является современным перспективным методом, применяемым в клинической практике. Принцип ФДТ основан на способности фотосенсибилизатора под действием света определенной длины волны генерировать активные формы кислорода и вызывать клеточную гибель. Главная проблема метода ФДТ заключается в потере оптической активности возбуждающего света в биологических тканях. Необходимость применения внешнего источника света в ФДТ ограничивает клиническое применение метода, тогда как создание внутренних источников света могло бы значительно расширить область применения фотодинамической терапии.

Для решения проблемы создания внутренних источников света мы предлагаем использовать явление биолюминесцентного резонансного переноса энергии, BRET (Bioluminescence resonance energy transfer), в основе которого лежит Фёрстеровский резонансный перенос энергии от донора к акцептору. Донором в разработанной нами системе является окисленная форма субстрата люциферазы NanoLuc, а акцептором - флуоресцентный фототоксичный белок miniSOG.

Мы показали, что люцифераза NanoLuc, экспрессируемая в эукариотических клетках в составе единой генетической конструкции с miniSOG, в присутствии субстрата фуримазина вызывает возбуждение фототоксичного флавопротеида miniSOG. При этом miniSOG проявляет фотоиндуцированную цитотоксичность. Смертность клеток в стабильно трансфицированной клеточной линии сильно зависит от субклеточной локализации miniSOG. Так, наибольший цитотоксический эффект *in vitro* достигается при экспрессии NanoLuc-miniSOG в мембранной локализации.

Предложенная в данной работе система активации фототоксина внутриклеточным источником света является доказательством возможности BRET-опосредованной ФДТ и в будущем позволит существенно расширить область применения фотодинамической терапии, преодолев проблему "окна прозрачности" биологических тканей.

Работа поддержана РФФ (грант № 16-14-10321).

9.27 УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ *PON1* В ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ МЫШЕЙ ЛИНИИ CBRB

Яненко Б.В.^{1,2}, Антипова Н.В.¹, Мусеева Е.В.¹, Аронов Д.А.¹, Шахпаронов М.И.¹

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

²Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА им. К.И. Скрябина, Москва

Электронный адрес: nadine.antipova@gmail.com,
b.v.yanenko@mail.ru

Ферменты семейства параоксоназ (PON) участвуют в воспалительном процессе, окислительном стрессе, фосфорорганическом обмене веществ. Изучена роль PON во врожденном иммунитете, а также при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, ожирении и онкологических процессах. Параоксоназа-1 (PON1) была первым исследованным ферментом PON, показана связь PON1 с липопротеинами высокой плотности плазмы крови. У хирургических больных с септическими осложнениями была выявлена низкая активность фермента PON1 по сравнению со здоровыми донорами, показана корреляция с повышенной смертностью. Для изучения механизмов развития сепсиса и разработки новых методов борьбы с ним необходимы адекватные мышинные модели. Ранее было показано, что мыши линии CBRB в условиях конвенционального содержания по мере старения демонстрируют постепенно развивающиеся признаки хронического дерматоза, который без симптоматического лечения может привести к сепсису.

Целью нашей работы являлось исследование уровня экспрессии *PON1* в клетках перитонеальной жидкости мышей линии CBRB с септическими проявлениями по сравнению со здоровыми мышами.

Материалы и методы. Стареющие самки мышей линии CBRB в возрасте 10,5±0,5 мес. с септическими проявлениями (опыт, n=5) на конечных стадиях и здоровые самки (контроль, n=4) были эвтаназированы. Взяты образцы клеток перитонеальной жидкости (n=9). Из клеток выделяли РНК тризолом, затем определяли уровень экспрессии *PON1* методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (RTQ-PCR).

Результаты исследования. Показано снижение уровня экспрессии *PON1* у мышей опытной группы на 2 порядка относительно контрольной (p<0,05, непараметрический критерий Манна-Уитни). Мы полагаем, что окружающая непатогенная и условно-патогенная микрофлора, не вызывающая заболевания у молодых мышей, осложняет течение atopического дерматита, приводя к возникновению ряда хронических инфекционно-воспалительных процессов в коже и внутренних органах, что, в свою очередь, у некоторых мышей обуславливает развитие сепсиса.

Выводы. Мышиная модель CBRB адекватно воспроизводит снижение уровня экспрессии *PON1* у септических больных в клинике. Такую модель можно использовать для изучения патогенеза и разработки новых методов лечения сепсиса.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абакушина Е.В.	97	Билова Т.Е.	108, 110	Воробьева Д.А.	163	Долежалъ В.	60
Авдеева Л.В.	39	Биркемайер К.	110	Воробьева Е.Е.	45	Доронин И.И.	125
Агапов А.А.	72	Бобик Т.В.	63	Воробьева И.Г.	113	Дроздова М.Г.	162
Ажикина Т.Л.	29, 78, 80	Бобкова Н.В.	8	Воронина Д.В.	114	Друца В.Л.	49
Акасов Р.А.	170, 183	Богданов И.В.	52	Воротников А.В.	176	Дубовский П.В.	44, 56
Акимов М.Г.	7, 169, 181, 182	Богданова Ю.С.	14	Вяткина О.В.	40	Дубовцева Е.С.	27, 51
Акинфиев В.С.	111, 130	Бойко А.А.	41, 161	Гавриков А.С.	115	Дубровский А.В.	128, 129, 133, 134
Александрова И.Ю.	8	Болосов И.А.	167	Гаврюшина И.А.	116	Дьяченко И.А.	172, 173
Алиев Т.К.	19	Болотова А.А.	113	Гагарская Ю.А.	46	Дьяченко О.В.	156
Андреев Я.А.	70, 173	Борзова В.А.	126	Гайнетдинов И.В.	80	Егозарьян Н.С.	120
Андрианова А.Г.	27, 51	Боровков И.М.	171	Гайнова К. М.	43, 47	Елецкая Б.З.	75
Антипова Н.В.	171, 187	Боровкова Е.И.	171	Галимова А.А.	117, 142	Емельянова А.А.	13, 21
Антонова Д.В.	5	Бородина Т.Н.	170	Ганнессен А.В.	121	Емельянова Е.В.	120
Аралкин О.Л.	40	Бородкина А.В.	102	Гаранина И.А.	77	Еремин С.А.	145
Аронов Д.А.	6, 187	Брылёв В.А.	10, 146	Гарафутдинов Р.Р.	30, 89, 117, 142	Ермак Т.В.	83
Арсеньев А.С.	96	Бугрова А.Е.	42, 71	Гарифулина А.И.	94	Ермакова Ю.Г.	14, 143
Артамонова Т.О.	54	Буданова У.А.	11	Гарковенко А.В.	45	Ерохина С.А.	15
Ашба А. М.	7	Букреева Т.В.	170, 183	Гвоздев Р.И.	39	Есипов Р.С.	179
Баглай А.И.	93	Буравлева Е.В.	85	Генералова А.Н.	164	Есюнина Д.М.	72
Багров Д.В.	135	Бурова Е.Б.	102	Георгиев П.Г.	34, 81	Ефременко А.В.	161
Балабанова Т.В.	162	Бурьянов Я.И.	156	Герасимович Е.С.	48	Ефремов Р.Г.	32, 56, 96
Баладин С.В.	21, 167	Быкадоров П.А.	76	Гилёва А.М.	11, 170	Жёлтиков А. М.	14
Баласаянц С.М.	8	Бычков М.Л.	41, 60, 70, 161	Глыбин А.В.	85	Жердев А.В.	145
Балацкая М.Н.	9, 93	Бычкова А.В.	42, 50, 71, 111, 130	Голева Т.Н.	104	Жмак М.Н.	94
Балке Г.У.	110	Вагида М.С.	163	Головко А.О.	49	Жузе А.Л.	23
Бальшева В.И.	123	Варламов В.П.	131	Гонтаренко В.Н.	163	Журина М.В.	121
Баранник А.П.	124	Василевский А.А.	68, 88	Горбачев Д.А.	17, 118	Завриев С.К.	79
Баринев Н.А.	157	Васильева А.Д.	42, 71	Городец М.Г.	50, 111	Зазыкина А.Д.	52
Баркова Д.В.	88	Васильева Е.Ю.	163	Грецкая Н.М.	7, 169, 181, 182	Зайкова Ю.Я.	54
Бармин Р.А.	160	Васильева Н.В.	177	Гречихина М.В.	22, 105, 179	Зайцева Ю.В.	147
Барсуков М.И.	84	Вассерман Л.А.	50	Григорев А.С.	29, 78	Зарайский А.Г.	25
Баталова А.А.	87	Васькина М.И.	43, 47	Гришина Т.В.	108, 110, 184	Захарченко Н.С.	156
Баторова Ю.А.	73	Весейхоанн Л.А.	110	Грюкова А.А.	102	Зацепин Т.С.	10
Безуглов В.В.	7, 181	Вихнина М.В.	184	Губайдуллин А.В.	116	Звезда Ю.К.	79
Белая И.А.	87	Вихров А.А.	149	Гудкова О.И.	119	Звягин А.В.	36
Беленко Д.П.	112	Власенков Л.А.	44	Гурская Н.Г.	136	Звягин И.В.	98, 101
Белецкий А.В.	74	Власова К.Ю.	11	Дамулин В.И.	171	Зелепукин И.В.	36
Белогуров А.А.	43, 47, 53, 59, 99	Во Тхи Нгок Ха	124	Данилова Т.А.	130	Зиневич Т.В.	62
Белоус Г.И.	172, 173	Водовозова Е.Л.	33	Даянова Л.К.	12	Зиновьева М.В.	24
Белоусов В.В.	14, 143	Водякова М.А.	162	Деев С.М.	36, 57, 132, 158, 186	Зинц А.	108
Бергер Р.	110	Волкова Т.Д.	8	Демина П.А.	164	Злобовская О.А.	17
Берзина М.Я.	75	Вольнский П.Е.	56	Демина Т.С.	162	Зотько Н.С.	137
Бертран Д.	60	Вольпина О.М.	8	Дерябин П.И.	102	Зубенко О.Д.	53
Биба М.В.	40	Воробьев И.И.	122, 140	Дзантиев Б.Б.	145	Зудина Ю.С.	8
Билан Д.С.	14			Дидио А.В.	108	Зыбин Д.И.	165
				Долгих Д.А.	19, 41, 60, 61, 66, 69, 161	Зыкова Е.А.	83

Иванов И.А.	28, 94, 95	Козлов И.А.	168	Локтюшов Е.В.	61	Мокрушина Ю.А.	31
Иванова А.С.	25	Кокшарова О.А.	148	Лопухова М.В.	130	Молодина В.В.	81
Иванова Е.Ю.	54	Колегова А.С.	109	Лукьянов К.А.	17, 115, 118, 136, 141	Мологковская И.М.	125
Иванова М.А.	166	Колоскова О.О.	11	Лукьянов С.А.	17	Молочков Н.В.	58
Иванова О.И.	163	Комеч Е.А.	98, 101	Луньков А.П.	131	Моргунов И.Г.	151
Иванова Ю.С.	18	Комков А.Ю.	82	Лысова Е.Ю.	170	Морозова О.В.	135
Ивасенко Д.А.	74	Кондратьева Л.Г.	24	Любецкий В.А.	25	Мурашев А.Н.	172, 173
Ивонцин Л.А.	55	Кондратьева С.А.	80	Люблинская О.Г.	18, 103	Мусин Е.В.	128, 129, 133, 134
Игнатов А.Н.	124	Кондря У.Р.	11	Люкманова Е.Н.	41, 60, 61, 69, 70, 161	Мучникова Е.А.	119
Илинг К.	108	Коновалова М.В.	179	Мажуга А.Г.	11	Мушкарина Т.Ю.	97
Ильин И.С.	122	Кононихин А.С.	42, 71	Мазурова А.С.	29, 78	Намсараев З.Б.	137
Ильина А.В.	131	Константинова И.Д.	159	Макеев В.Ю.	76	Нарциссов Я.Р.	55
Ильина Е.Н.	19	Константинова М.Л.	50	Максименко О.Г.	34	Неганова М.Е.	160
Иматдинов А.Р.	123	Копанцев Е.П.	24	Максимов Е.Г.	91	Нестеренко А.М.	25
Индейкина М.И.	42, 71	Корниенко Ю.С.	103	Максимова М.А.	30	Нестерова И.В.	8
Иноземцева О.А.	123	Коросев Д.О.	8	Малков А.А.	185	Нечаев А.В.	164
Ищенко А.А.	92, 165, 168	Королева О.Н.	49	Мамаева А.С.	137	Никитин М.П.	36, 132
Ищенко А.М.	64	Короткова Д.Д.	25	Мамедов И.З.	82, 98	Никитин П.И.	36
Кабанова А.П.	124	Коршун В.А.	10, 146, 185	Маракаев О.А.	147	Никольский Н.Н.	18
Кадников В.В.	20, 74	Корягина Т.Б.	113	Марголис Л.Б.	163	Нольде Д.Е.	32
Казакова Е.Д.	56	Котлобай А.А.	31	Марданов А.В.	74	Нугманов Г.А.	82
Калашников А.А.	167	Коцарева О.Д.	127	Марквичева Е.А.	11, 123, 162, 170, 183	Обухова Е.А.	171
Калашникова М.Б.	21	Кошкин С.А.	166	Маркина Н.М.	31	Овченкова А.П.	104
Калиберда Е.Н.	63	Крюкова Е.В.	28	Маркосян К.А.	126	Овчинникова Т.В.	13, 21, 52, 167
Калиновский Д.В.	86, 125	Куджаев А.М.	27, 51	Мартынов В.И.	67	Олейников В.А.	23
Камынина А. В.	8	Кудрявцев Д.С.	88, 95	Мартьянов С.В.	121	Орлов М.А.	83
Каневский Л.М.	15, 97	Кудряева А.А.	43, 47, 53, 59	Маслов И.О.	62	Орлова Н.А.	122, 140
Капрельянц А.С.	29, 78	Кудрякова Г.Х.	116, 119	Маслова М.В.	162	Осмаков Д.И.	70
Капустин Д.В.	165, 168	Кузнецова И.М.	46, 65	Масчан М.А.	101	Павленко Д.М.	113
Кара Д.А.	126	Кузьменков А.И.	68, 88	Машков О.И.	89	Павлова Е.Р.	135
Касаткина М.А.	162	Кузьмин Д.В.	13, 21, 137	Машковцева Е.В.	55	Паликов В.А.	172, 173
Кашеверов И.Е.	95	Кузьмина Е.Г.	97	Медведев С.С.	108, 184	Паликова Ю.А.	172, 173
Каширина Е.И.	127	Куликов А.М.	84	Мельникова Д.Н.	52	Палкина К.А.	174
Кельмансон И.В.	14	Куличкова В.А.	106	Мельникова Л.С.	81	Панина И.С.	32
Кенда А.М.	119	Кульбацкий Д.С.	60, 61	Микулинская Г.В.	58	Панова А.В.	175
Кильдеева Н.Р.	162	Кульбачинский А.В.	72	Милютин А.Н.	130	Пантелеев П.В.	13, 21, 167
Килячус М.С.	22	Курганов Б.И.	126	Мингерзина Э.Р.	169	Пантелеев С.В.	63
Ким А.Л.	128, 129, 133, 134	Кутузова Н.М.	84	Минервина А.А.	82	Парамонов А.С.	60, 61, 96
Кирпичников М.П.	19, 60, 69	Лаврова А.В.	169	Мирошников К.А.	124	Патрушев Л.И.	12
Киселева Д.В.	57	Лазарев В.Н.	157	Мисин В.М.	111	Паудель Г.	110
Клементьева Н.В.	136	Ланин А.А.	14	Мишин А.С.	17, 115, 118, 136	Пахомов А.А.	67
Клинов Д.В.	135, 157	Ларина М.В.	19	Мищенко Д.В.	160	Пеньёр С.	68
Клячко Н.Л.	11	Ларионова Т. Д.	86	Моисеев Я.П.	132	Перфилов М.М.	136
Коваленко А.О.	58	Лебедев Д.С.	28	Моисеева Е.В.	6, 187	Пестов Н.Б.	86
Коваленко Е.И.	15, 97	Лебедев Ю.Б.	82, 98, 101			Петровская М.А.	90
Коваль В.С.	23	Лебедева А.М.	163			Петросян Н.С.	96
Ковнир С.В.	122	Липкин В.М.	45				

Петрунин А.В.	11	Сапожникова К.А.	146	Сузина Н.Е.	120	Фролова А.Ю.	67
Петрушкина М.А.	137	Саркисян К.С.	17, 31, 118	Сулацкая А.И.	65	Фунтикова Т.В.	155
Пивоваров В.Д.	138	Сарычев Г.А.	11	Суслина А.В.	29	Фурс О.В.	156
Пиголева С.В.	156	Сафенкова И.В.	145	Сыбачин А.В.	178	Хайдуков Е.В.	164
Пискарева А.А.	140	Сахабутдинова А.Р.	30, 89, 117, 142	Сычева А.Л.	98	Харитоновна М.И.	150
Плакунов В.К.	121	Свердлов Е.Д.	5	Сычева А.М.	101	Хартиг В.	69
Плешкан В.В.	5	Свешников П.Г.	19	Тараканов П.А.	160	Хмель И.А.	109, 148
Плюта В.А.	109, 148	Свищевская Е.В.	35, 105, 127, 178,	Терёхина Я.А.	152	Хованкина А.В.	183
Поварова О.И.	46		179	Терёшина М.Б.	25	Ходак Ю.А.	122, 140
Погорелый М.В.	98	Себякин Ю.Л.	11	Тетенева А.Н.	121	Ходжаева Р.Н.	119
Подвальная Н.М.	141	Селенина А.В.	106	Титгат Я.	68	Ходорковский М.А.	54
Подкуйченко Н.В.	176	Селиверстов А.В.	25	Тихоненко С.А.	128, 129, 133, 134	Холоденко И.В.	125
Пожарицкая О.Н.	152	Семушина С.Г.	6	Тихонов М.В.	34	Холоденко Р.В.	125
Поливцева В.Н.	120	Серебровская Е.О.	141	Ткачук В.А.	9, 93	Хохенваргер В.	108
Полтавцев А.М.	105	Серова О.В.	27	Токунова Ю.А.	153	Хоченков Д.А.	164
Полтавцева Р.А.	105	Сечин Е.Н.	147	Толкунова Е.Н.	166	Царев А.В.	61
Поляничко А.М.	87	Сивопляс Е.А.	84	Томилин А.Н.	106	Цетлин В.И.	28, 88, 95
Померанцева Е.А.	81	Сидоров А.В.	147	Томсен М.С.	60, 69	Цимоха А.С.	54, 106, 107
Попова А.А.	109, 148	Сидорова Д.Е.	148	Травкина В.И.	87	Чанцева В.В.	108
Пронкин П.Г.	50, 130	Силкина Н.И.	181	Третьякова Д.С.	33	Чекина А.А.	184
Простякова А.И.	149, 165	Симонова М.А.	138	Трофимов А.В.	64	Чекунова А.И.	84
Протас К.Г.	177	Скворцова Ю.В.	80	Троянова Н.И.	100	Чернов И.П.	24
Прохоров Д.А.	58	Случанко Н.Н.	91	Трушина Д.Б.	183	Черноруцкий М.В.	175
Прошкина Г.М.	57, 158, 186	Смирнов И.В.	172	Тугаева К.В.	91	Чернышов С.В.	58
Пуговкина Н.А.	18, 103	Смирнова Е.В.	45, 92	Туроверов К.К.	46, 65	Черткова Р.В.	66, 67
Рак А.Я.	64	Смирнова О.С.	159	Тюрин О.В.	159	Чикунова А.П.	130
Раkitина Т.В.	45	Смоликова Г.Н.	108, 184	Украинская В.М.	99	Чистов А.А.	146, 185
Рахматуллина А.И.	142	Соболева А.	184	Успенский С.А.	162	Чихиржина Е.В.	87
Ревазян А.С.	143	Солдатова Я.А.	182	Устинов А.В.	10	Чугунов А.О.	32, 60, 96
Рогов А.Г.	104	Солопова О.Н.	19	Уткин Ю.Н.	28, 88	Чудаков Д.Б.	35, 127
Родина Н.П.	65	Соляникова И.П.	120	Уткина М.В.	34	Чудецкий И.С.	68
Розенфельд М.А.	42, 50, 71, 130	Сорокин А.А.	83	Уткина Н.К.	95	Чупин В.В.	44
Романовская Е.В.	184	Сорокин Б.А.	137	Фалетров Я.В.	91	Чуприянова Т.А.	109
Рочева В.В.	164	Сорокина С.Ю.	84	Фаттахова Г.В.	127	Шагдарова Б.Ц.	131
Румш Л.Д.	63	Сочилина А.В.	149	Федорина А.С.	100	Шайбакова И.Д.	157
Рыбченко В.С.	144	Спелков А.А.	97	Федоров И.А.	107	Шаронов Г.В.	9, 161
Рябова А.В.	57	Спирова Е.Н.	94, 95	Федотов И.В.	14	Шаронова Н.В.	92
Рябухина Е.В.	178	Старков В.Г.	28	Фельдман Н.Б.	119	Шатрова А.Н.	102
Рязанцев Д.Ю.	114, 138	Стафеев Ю.С.	176	Фелькер Е.И.	163	Шахпаронов М.И.	187
Рясик А.А.	83	Стахеев А.А.	79	Феофанов А.В.	88, 161	Шевченко М.А.	100
Сазонова А.А.	66	Степаненко В.Н.	113, 159	Филатова М.П.	8	Шевчук Т.В.	156
Салина Е.Г.	29, 78	Степанов А.В.	99	Филимонова А.В.	137	Шелухина И.В.	88, 94, 95
Самохвалов А.В.	145	Степанов М.Р.	150	Фисунов Г.Ю.	77	Шенкарев З.О.	60, 61, 96
Самохин А.Н.	8	Степанова Н.Н.	151	Фомченкова В.Е.	101	Шилова О.Н.	158
Санарова Д.Д.	67	Стоник В.А.	95	Франк Ю.А.	20	Шипунова В.О.	36
Санков В.А.	179	Стрельцова М.А.	15, 97	Фридман М.В.	76	Ширшиков Ф.В.	124
Сапожников А.М.	22, 100	Стрешнев Ф.П.	146, 185	Фролов А.А.	108, 110, 184	Шкатова А.Н.	22

Шмендель Е.В.	11	Шумилина Ю.С.	110
Шнейдер М.М.	124	Шустова О.А.	22
Шолина Н.В.	164	Ю рина Л.В.	42, 71
Шохина А.Г.	14	Я гудаева Е.Ю.	92
Шпектор А.В.	163	Ямпольский И.В.	31
Шрам С.И.	141	Яненко Б.В.	187
Шрамова Е.И.	186	Яренчук А.С.	159
Шулепко М.А.	41, 60, 61, 69, 70, 161	Ярославов А.А.	178

СОДЕРЖАНИЕ ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

ПОИСК МОДЕЛЬНЫХ КЛЕТЧНЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ FAP В КАЧЕСТВЕ МИШЕНИ ПРИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ <i>Антонова Д.В., Плешкан В.В., Свердлов Е.Д.</i>	5
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ПРЕДСКАЗЫВАЮТ ВОЗНИКНОВЕНИЕ СПОНТАННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШИ <i>Аронов Д.А., Семушина С.Г., Моисеева Е.В.</i>	6
ПЕРЕДАЧА ВНУТРИКЛЕТЧНОГО СИГНАЛА ПРИ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ ФЕОХРОМОЦИТОМЫ PC12 N-АЦИЛДОФАМИНАМИ <i>Аиба А. М., Акимов М.Г., Грецкая Н.М., Безуглов В.В.</i>	7
ВЫЯВЛЕНИЕ ФРАГМЕНТА РЕЦЕПТОРА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ, ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА <i>Баласаняни С.М., Волкова Т.Д., Зудина Ю.С., Камынина А. В., Короев Д.О., Филатова М.П., Александрова И.Ю., Нестерова И.В., Самохин А.Н., Бобкова Н.В., Вольпина О.М.</i>	8
РАЗЛИЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДВУХ ЛИГАНДОВ ОДНОГО РЕЦЕПТОРА: АДИПОНЕКТИН И ЛИПОПРОТЕИДЫ КАК ЛИГАНДЫ ГФИ-ЗАЯКОРЕННОГО РЕЦЕПТОРА Т-КАДГЕРИНА <i>Балацкая М.Н., Шаронов Г.В., Ткачук В.А.</i>	9
ПОЛУЧЕНИЕ ДИСКРЕТНЫХ ДНК-НАНОСТРУКТУР ГИБРИДИЗАЦИЕЙ РАЗВЕТВЛЕННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИД-ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ КОНЪЮГАТОВ <i>Брылёв В.А., Коришун В.А., Зацепин Т.С., Устинов А.В.</i>	10
МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЛИПОСОМЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ В МОДЕЛЯХ <i>IN VITRO</i> <i>Гилёва А.М., Петрунин А.В., Власова К.Ю., Кондря У.Р., Сарычев Г.А., Буданова У.А., Шмендель Е.В., Колоскова О.О., Себякин Ю.Л., Мажуга А.Г., Клячко Н.Л., Марквичева Е.А.</i>	11
ЭКСПРЕССИЯ микроРНК hsa-mir-5096 В КЛЕТКАХ HeLa С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИНИГЕНА TurboGFP <i>Даянова Л.К., Патрушев Л.И.</i>	12
ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ α -СПИРАЛЬНОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА SMAR-28 ИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ КОЗЫ <i>SAPRA HIRSA</i> <i>Емельянова А.А., Кузьмин Д.В., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В.</i>	13
ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ НЕЙРОНОВ С КЛЕТЧНЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ <i>Ермакова Ю.Г., Ланин А.А., Федотов И.В., Шохина А.Г., Кельмансон И.В., Билан Д.С., Богданова Ю.С., Жёлтиков А. М., Белоусов В.В.</i>	14
HLA-DR КАК МАРКЕР ОСОБОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НК-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА <i>Ерохина С.А., Стрельцова М.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И.</i>	15

СВЕТОЗАВИСИМАЯ АКТИВАЦИЯ И ДЕТЕКЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ <i>Злобовская О.А., Саркисян К.С., Горбачев Д.А., Мишин А.С., Лукьянов С.А., Лукьянов К.А.</i>	17
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА <i>Иванова Ю.С., Люблинская О.Г., Пуговкина Н.А., Никольский Н.Н.</i>	18
ПОЛУЧЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ГЛИКОПРОТЕИНУ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ДЛЯ ЭКСТРЕННОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЯ <i>Ильина Е.Н., Солопова О.Н., Алиев Т.К., Ларина М.В., Долгих Д.А., Свешников П.Г., Кирпичников М.П.</i>	19
РАЗНООБРАЗИЕ СОСТАВА И МЕТАБОЛИЗМА МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ГЛУБИННОЙ ПОДЗЕМНОЙ БИОСФЕРЫ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ, ВЫЯВЛЕННОЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛИЗА <i>Кадников В.В., Франк Ю.А.</i>	20
ВЛИЯНИЕ N- И C-КОНЦЕВЫХ МОДИФИКАЦИЙ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ТАХИПЛЕЗИНА I <i>Калашикова М.Б., Емельянова А.А., Кузьмин Д.В., Пантелеев П.В., Баландин С.В., Овчинникова Т.В.</i>	21
ПРОСТАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ БТШ70 <i>Кляйчус М.С., Шустова О.А., Гречихина М.В., Шкатова А.Н., Сапожников А.М.</i>	22
НОВЫЕ СЕРИИ ДИМЕРНЫХ БИСБЕНЗИМИДАЗОЛОВ - ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ДНК-СПЕЦИФИЧНЫХ УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ <i>Коваль В.С., Жузе А.Л., Олейников В.А.</i>	23
ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ МАСТЕР РЕГУЛЯТОРОВ РАЗВИТИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ОПУХОЛЕВЫХ ОБРАЗЦАХ <i>Кондратьева Л.Г., Чернов И.П., Копанцев Е.П., Зиновьева М.В.</i>	24
РОЛЬ НОВОГО ТРАНСМЕМБРАННОГО БЕЛКА ХОЛОДНОКРОВНЫХ c-Answer В РЕГЕНЕРАЦИИ И РАЗВИТИИ МОЗГА У ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ <i>Короткова Д.Д., Иванова А.С., Любецкий В.А., Селиверстов А.В., Нестеренко А.М., Терёшина М.Б., Зарайский А.Г.</i>	25
ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ N-КОНЦЕВОЙ ОБЛАСТИ LonA-ПРОТЕАЗЫ E. COLI В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ФЕРМЕНТА <i>Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г.</i>	27
ЛИГАНДЫ ЦИС-ПЕТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИЗ ЯДА СЕРОЙ ЖАБЫ BUFO BUFO <i>Лебедев Д.С., Иванов И.А., Крюкова Е.В., Старков В.Г., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н.</i>	28
МАЛАЯ НЕКОДИРУЮЩАЯ РНК MTS1338 В АДАПТАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ К МАКРОФАГАЛЬНОМУ СТРЕССУ <i>Мазурова А.С., Григоров А.С., Суслина А.В., Салина Е.Г., Капрельянц А.С., Ажикина Т.Л.</i>	29

ВЛИЯНИЕ SYBR Green I НА ОБРАЗОВАНИЕ НЕСПЕЦИФИЧНЫХ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ "КАТЯЩИМСЯ КОЛЬЦОМ" С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗЫ Bst exo ⁺ <i>Максимова М.А., Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р.</i>	30
ГИСПИДИН-3-ГИДРОКСИЛАЗА: ФЕРМЕНТ БИОСИНТЕЗА ЛЮЦИФЕРИНА ВЫСШИХ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ГРИБОВ <i>Маркина Н.М., Котлобай А.А., Мокрушина Ю.А., Саркисян К.С., Ямпольский И.В.</i>	31
СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ЛАНТИБИОТИКОМ НИЗИН И ЛИПИДОМ-II В БИОМЕМБРАНЕ <i>Панина И.С., Чузунов А.О., Нольде Д.Е., Ефремов Р.Г.</i>	32
ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ НА УСТОЙЧИВОСТЬ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛИПОСОМ, НЕСУЩИХ В БИСЛОЕ ЛИПОФИЛЬНОЕ ПРОЛЕКАРСТВО МЕЛФАЛАНА <i>Третьякова Д.С., Водовозова Е.Л.</i>	33
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ТРАНС-СПЛАЙСИНГА У <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Уткина М.В., Максименко О.Г., Георгиев П.Г., Тихонов М.В.</i>	34
ВЛИЯНИЕ БЕТА-АЛАНИНА И АТФ НА ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ К АЛЛЕРГЕНАМ В НИЗКОДОЗОВОЙ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ <i>Чудаков Д.Б., Свирицевская Е.В.</i>	35
НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ПОВЕРХНОСТНОЙ МОДИФИКАЦИИ НАНОСТРУКТУР С ЦЕЛЬЮ ИХ ЭФФЕКТИВНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ <i>Шипунова В.О., Зелезукин И.В., Никитин П.И., Никитин М.П., Звягин А.В., Деев С.М.</i>	36

ТЕЗИСЫ СТЕНДОВЫХ СООБЩЕНИЙ

СЕКЦИЯ 1

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ. БИОКАТАЛИЗ

- 1.1 ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СОХРАНЕНИЕ АКТИВНОСТИ
МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ МЕТАНМОНООКСИГЕНАЗЫ ИЗ
METHYLOCOCCUS CAPSULATUS (M)
Авдеева Л.В., Гвоздев Р.И. 39
- 1.2 ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ СИЛИКАГЕЛЕВОЙ ПОДЛОЖКИ НА
КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ
ПЕРОКСИДАЗЫ РЕДЬКИ ЧЕРНОЙ
Аралкин О.Л., Биба М.В., Вяткина О.В. 40
- 1.3 СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ТРЕХПЕТЕЛЬНОГО БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА SLURP-2
*Бойко А.А., Бычков М.Л., Шулепко М.А., Долгих Д.А.,
Люкманова Е.Н.* 41
- 1.4 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОЗОН-ИНДУЦИРОВАННОГО
СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ НА СТРУКТУРУ
ФИБРИНСТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО ФАКТОРА МЕТОДОМ
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
*Васильева А.Д., Бычкова А.В., Юрина Л.В., Бугрова А.Е.,
Индейкина М.И., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Розенфельд М.А.* .. 42
- 1.5 ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА
УБИКВИТИНА В ТЕРМИНАХ ДИНАМИЧЕСКОГО РАВНОВЕСИЯ,
ОПРЕДЕЛЯЮЩЕГО ДЛИНУ ПОЛИУБИКВИТИНОВОЙ ЦЕПИ, И
ВРЕМЕНИ ПОЛУЖИЗНИ МОНОМЕРНОЙ ЕДИНИЦЫ
Васькина М.И., Кудряева А.А., Гайнова К.М., Белогуров А.А. 43
- 1.6 ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА -
ХИМИЧЕСКИЙ СДВИГ В РЯДУ ДИСУЛЬФИД-БОГАТЫХ
ПЕПТИДНЫХ ТОКСИНОВ
Власенков Л.А., Чупин В.В., Дубовский П.В. 44
- 1.7 ПОИСК ПАРТНЕРОВ БЕЛКА EIF1AD
*Воробьева Е.Е., Ракитина Т.В., Гарковенко А.В., Смирнова Е.В.,
Липкин В.М.* 45
- 1.8 ВЛИЯНИЕ КРАУДИНГ АГЕНТОВ ДЕКСТРАНА-70К И
ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ-8000 НА СТРУКТУРУ АКТИНА И
ПРОЦЕССЫ ЕГО ДЕНАТУРАЦИИ
Гагарская Ю.А., Поварова О.И., Кузнецова И.М., Туроверов К.К. ... 46
- 1.9 ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕАСОМ-ОПОСРЕДОВАННОГО
МЕТАБОЛИЗМА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ В
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ С ПРИМЕНЕНИЕМ
ДНК-КОДИРУЕМОЙ РЕЗОРУФИН-ЛИГАЗЫ
Гайнова К.М., Васькина М.И., Кудряева А.А., Белогуров А.А. 47
- 1.10 СВОЙСТВА МУТАНТОВ α B-КРИСТАЛЛИНА (HspB5)
С ТОЧЕЧНЫМИ ЗАМЕНАМИ В С-КОНЦЕВОМ ДОМЕНЕ,
ЭКСПРЕССИЯ КОТОРЫХ КОРРЕЛИРУЕТ С ВРОЖДЕННЫМИ
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЧЕЛОВЕКА
Герасимович Е.С. 48

- 1.11 ИЗУЧЕНИЕ АГРЕГАЦИОННЫХ СВОЙСТВ МУТАНТНЫХ
ВАРИАНТОВ БЕЛКА ЯДЕРНОГО ЭКСПОРТА (NER)
ВИРУСА ГРИППА А
Головка А.О., Королева О.Н., Друца В.Л. 49
- 1.12 ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ АЛЬБУМИНА
МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ
КАЛОРИМЕТРИИ
*Горобец М.Г., Бычкова А.В., Вассерман Л.А., Константинова М.Л.,
Пронкин П.Г., Розенфельд М.А.* 50
- 1.13 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКЗОГЕННОЙ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА
ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ LonA-ПРОТЕАЗЫ ИЗ *E. COLI*
Дубовцева Е.С., Кудряев А.М., Андрианова А.Г. 51
- 1.14 ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ИЗОФОРМ ЛИПИД-
ТРАНСПОРТИРУЮЩИХ БЕЛКОВ ЧЕЧЕВИЦЫ И ГОРОХА
Зазыкина А.Д., Богданов И.В., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. .. 52
- 1.15 ИССЛЕДОВАНИЕ ТОПОЛОГИИ ЗАРЯД-ОПОСРЕДОВАННОГО
МИЕЛИН-ПОДОБНОГО ДЕГРОНА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕГО ГИДРОЛИЗ
СУБСТРАТОВ ПРОТЕАСОМОЙ БЕЗ УЧАСТИЯ УБИКВИТИНА
Зубенко О.Д., Кудряева А.А., Белогуров А.А. 53
- 1.16 УКРОЧЕННАЯ ФОРМА α -ТУБУЛИНА ОБНАРУЖЕНА
В КОМПЛЕКСЕ С ОЧИЩЕННЫМИ ПРОТЕАСОМАМИ
*Иванова Е.Ю., Артамонова Т.О., Зайкова Ю.Я., Ходорковский М.А.,
Цимиха А.С.* 54
- 1.17 МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОТОННОГО ТРАНСПОРТА
В F₀F₁-АТФсинтазе С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
КВАНТОВО-МЕХАНИЧЕСКОГО ПОДХОДА
Ивонцин Л.А., Машковцева Е.В., Нарциссов Я.Р. 55
- 1.18 ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛАТАРЦИНОВ С МЕМБРАНАМИ
ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ
Казакова Е.Д., Дубовский П.В., Вольнский П.Е., Ефремов Р.Г. 56
- 1.19 ВЛИЯНИЕ СИГНАЛЬНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ KDE1 И
REDLK НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ HER2-СПЕЦИФИЧНОГО
ТОКСИНА DARP_{in}-LoPE40
Киселева Д.В., Прошкина Г.М., Рябова А.В., Деев С.М. 57
- 1.20 ИССЛЕДОВАНИЕ Ca²⁺ РЕГУЛЯЦИИ L,D-ПЕПТИДАЗЫ
БАКТЕРИОФАГА T5 МЕТОДОМ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО
МУТАГЕНЕЗА
*Коваленко А.О., Чернышов С.В., Прохоров Д.А., Молочков Н.В.,
Микулинская Г.В.* 58
- 1.21 МЕХАНИЗМ ГИДРОЛИЗА ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА
ПРОТЕАСОМОЙ
Кудряева А.А., Белогуров А.А. 59

1.22	СЕКРЕТИРУЕМАЯ ИЗОФОРМА БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА Lynx1 (SLURP-2) РЕГУЛИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕРЕЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ НЕ-НЕЙРОНАЛЬНЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ <i>Кульбацкий Д.С., Люкманова Е.Н., Шулепко М.А., Шенкарев З.О., Бычков М.Л., Парамонов А.С., Чузунов А.О., Томсен М.С., Долежалъ В., Бертран Д., Кирпичников М.П., Долгих Д.А.</i> 60	60
1.23	БАКТЕРИАЛЬНАЯ ПРОДУКЦИЯ И СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАЛОИЗУЧЕННЫХ "ТРЕХ-ПЕТЕЛЬНЫХ" БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА Lypd6 И Lypd6b <i>Локтюшов Е.В., Кульбацкий Д.С., Шулепко М.А., Царев А.В., Шенкарев З.О., Парамонов А.С., Долгих Д.А., Люкманова Е.Н.</i> 61	61
1.24	ПОИСК НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ДИПЕПТИДИЛ-ПЕПТИДАЗЫ-IV - ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА <i>Маслов И.О., Зиневич Т.В.</i> 62	62
1.25	СРАВНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ РЕКОМБИНАНТНОГО КАТЕПСИНА L ИЗ КИШЕЧНИКА ЖУКА-КОЖЕЕДА <i>DERMESTES MACULATUS</i> <i>Пантелеев С.В., Калиберда Е.Н., Бобик Т.В., Руми Л.Д.</i> 63	63
1.26	ИССЛЕДОВАНИЕ АФФИННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИМЮЛЛЕРОВА ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА <i>Рак А.Я., Трофимов А.В., Ищенко А.М.</i> 64	64
1.27	СТРУКТУРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА, ЛИЗОЦИМА И БЕТА-2-МИКРОГЛОБУЛИНА <i>Родина Н.П., Сулацкая А.И., Кузнецова И.М., Туроверов К.К.</i> 65	65
1.28	МУТАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ ЦИТОХРОМА C ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕРМЕАБИЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМ C/КАРДИОЛИПИН <i>Сазонова А.А., Черткова Р.В., Долгих Д.А.</i> 66	66
1.29	ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ФОТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ПРЕВРАЩЕНИЯ ХРОМОФОРА В ФОТОКОНВЕРТИРУЕМОМ БЕЛКЕ Dendra2 <i>Санарова Д.Д., Черткова Р.В., Фролова А.Ю., Пахомов А.А., Мартынов В.И.</i> 67	67
1.30	НОВЫЙ МОДУЛЬНЫЙ ТОКСИН <i>OSKβ1</i> ИЗ ЯДА СКОРПИОНА <i>ORTHOCHIRUS SCROVICULOSUS</i> <i>Чудецкий И.С., Кузьменков А.И., Пеньёр С., Титгат Я., Василевский А.А.</i> 68	68
1.31	Lynx1 КОНКУРИРУЕТ С $\alpha\beta 1$ -42 ЗА СВЯЗЫВАНИЕ С НИКОТИНОВЫМИ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ <i>Шулепко М.А., Долгих Д.А., Хартиг В., Кирпичников М.П., Томсен М., Люкманова Е.Н.</i> 69	69

1.32	РЕКОМБИНАНТНЫЙ МАМБАЛГИН-2 ИЗ ЯДА <i>DENDROASPIS POLYLEPIS</i> ЗАМЕДЛЯЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА U251MG <i>Шулепко М.А., Бычков М.Л., Андреев Я.А., Осмаков Д.И., Люкманова Е.Н.</i> 70	70
1.33	ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОЗОН-ИНДУЦИРОВАННОГО СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФИБРИНОГЕНА МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ <i>Юрина Л.В., Васильева А.Д., Бычкова А.В., Бугрова А.Е., Индейкина М.И., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Розенфельд М.А.</i> 71	71

СЕКЦИЯ 2

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

2.1	РОЛЬ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ И РЕПАРАЦИИ <i>D. RADIODURANS</i> В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ НА ПОВРЕЖДЕННЫХ МАТРИЦАХ <i>Агапов А.А., Есюнина Д.М., Кульбачинский А.В.</i> 72	72
2.2	СИНТЕЗ МОНОМЕРОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ НАНОКОРПУСКУЛЯРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДНК <i>Баторова Ю.А.</i> 73	73
2.3	МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА КИСЛЫХ ДРЕНАЖНЫХ ВОД ЗОЛОТОДОБЫВАЮЩЕЙ ШАХТЫ "КОМСОМОЛЬСКАЯ" КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ <i>Белецкий А.В., Кадников В.В., Ивасенко Д.А., Марданов А.В.</i> 74	74
2.4	СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПО 2 И 6 ПОЛОЖЕНИЯМ ПУРИНОВОГО ОСНОВАНИЯ <i>Берзина М.Я., Елецкая Б.З.</i> 75	75
2.5	АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОБОГАЩЕННОСТИ ЛОКУСОВ, ВЫЯВЛЕННЫХ ПО ДАННЫМ GWAS КАК АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА <i>Быкадоров П.А., Фридман М.В., Макеев В.Ю.</i> 76	76
2.6	ПОИСК МИШЕНЕЙ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ БАКТЕРИЙ МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ <i>Гаранина И.А., Фисунов Г.Ю.</i> 77	77
2.7	ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕСУСИТАЦИИ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Григорьев А.С., Салина Е.Г., Мазурова А.С., Капрельянц А.С., Ажжикина Т.Л.</i> 78	78
2.8	ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ <i>TRI9</i> И <i>TRI14</i> У ГРИБОВ РОДА <i>FUSARIUM</i> , ПРОДУЦИРУЮЩИХ ТРИХОТОЦЕНОВЫЕ МИКОТОКСИНЫ <i>Звездина Ю.К., Стахеев А.А., Завриев С.К.</i> 79	79

2.9	ИССЛЕДОВАНИЕ БИОГЕНЕЗА пиРНК В ГЕРМИНОГЕННЫХ ОПУХОЛЯХ ЯИЧКА <i>Кондратьева С.А., Гайнетдинов И.В., Скворцова Ю.В., Ажикина Т.Л.</i>	80
2.10	ЭНХАНСЕР EN1A D. MELANOGASTER СОДЕРЖИТ КОММУНИКАТОРНЫЙ ЭЛЕМЕНТ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЙ ДИСТАНЦИОННЫЕ ЭНХАНСЕР - ПРОМОТОРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ <i>Молодина В.В., Мельникова Л.С., Померанцева Е.А., Георгиев П.Г.</i>	81
2.11	РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМОВ АНАЛИЗА ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ПОИСКА СОМАТИЧЕСКИХ ИНСЕРЦИЙ РЕТРОЭЛЕМЕНТОВ <i>Нугманов Г.А., Комков А.Ю., Минервина А.А., Мамедов И.З., Лебедев Ю.Б.</i>	82
2.12	АНАЛИЗ ПРОФИЛЕЙ ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОМОТОРОВ E. COLI С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ <i>Орлов М.А., Рясик А.А., Зыкова Е.А., Ермак Т.В., Сорокин А.А.</i>	83
2.13	ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭВОЛЮЦИИ РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ И ПРОМОТОРА ЭВОЛЮЦИОННО КОНСЕРВАТИВНОГО ГЕНА Dras1 <i>Сивопляс Е.А., Сорокина С.Ю., Барсуков М.И., Чекунова А.И., Кутузова Н.М., Куликов А.М.</i>	84

СЕКЦИЯ 3

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ, ЛИПИДОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ

3.1	ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ <i>Глыбин А.В., Буравлева Е.В.</i>	85
3.2	ЛИЗИЛОКСИДАЗА КАТАЛИЗИРУЕТ ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ АМИНОГЛИКОЗИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ <i>Ларионова Т.Д., Калиновский Д.В., Пестов Н.Б.</i>	86

СЕКЦИЯ 4

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

4.1	ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ РАСТВОРОВ КОМПЛЕКСОВ ДНК С cis- И trans-ДДП <i>Баталова А.А., Белая И.А., Поляничко А.М., Травкина В.И., Чихиржина Е.В.</i>	87
-----	---	----

4.2	ДЕЙСТВИЕ ТОКСИНОВ ИЗ ЯДОВ ЗМЕЙ НА ПОТЕНЦИАЛУПРАВЛЯЕМЫЕ КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ <i>Баркова Д.В., Шелухина И.В., Кузьменков А.И., Кудрявцев Д.С., Василевский А.А., Феофанов А.В., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И.</i>	88
4.3	ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА ПРОТЕКАНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ "КАТЯЩИМСЯ КОЛЬЦОМ" С ДНК ПОЛИМЕРАЗАМИ Bst exo ⁺ И Vent exo ⁺ <i>Маишков О.И., Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р.</i>	89
4.4	НОВЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА КОНДИЦИОНИРОВАННЫХ СРЕД <i>Петровская М.А.</i>	90
4.5	ПОИСК ОПТИМАЛЬНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛОГА ХОЛЕСТЕРОЛА СРЕДИ ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ С РАЗЛИЧНЫМ ПОЛОЖЕНИЕМ NVD-ГРУППЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С БЕЛКОМ Star <i>Тузаева К.В., Фалетров Я.В., Максимов Е.Г., Случанко Н.Н.</i>	91
4.6	ГИДРОФИЛИЗАЦИЯ ЧАСТИЦ НАНОКРЕМНИЯ ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ПРИМЕНЕНИЯ IN VIVO <i>Щаронова Н.В., Ищенко А.А., Смирнова Е.В., Ягудаева Е.Ю.</i>	92

СЕКЦИЯ 5

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЗНАВАНИЯ БИОМОЛЕКУЛ И ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В КЛЕТКЕ

5.1	N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ T-КАДГЕРИНА ВЛИЯЕТ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ СИГНАЛИЗАЦИЮ ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ <i>Баглай А.И., Балацкая М.Н., Ткачук В.А.</i>	93
5.2	ХАРАКТЕРИСТИКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭНДОГЕННЫХ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ, ЭКСПРЕССИРОВАННЫХ В КЛЕТКАХ SH-SY5Y, МЕТОДОМ КАЛЬЦИЕВОГО ИМИДЖИНГА <i>Гарифулина А.И., Спирина Е.Н., Жмак М.Н., Иванов И.А., Шелухина И.В.</i>	94
5.3	ИНГИБИРОВАНИЕ МЫШЕЧНОГО НИКОТИНОВОГО АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА МАКАЛУВАМИНОМ G <i>Кудрявцев Д.С., Спирина Е.Н., Иванов И.А., Шелухина И.В., Уткина Н.К., Кашеверов И.Е., Стоник В.А., Цетлин В.И.</i>	95
5.4	МЕТОДЫ КОМПЬЮТЕРНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ПЕПТИДНЫМИ ТОКСИНАМИ ИЗ ЯДА ПАУКА И ПОТЕНЦИАЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫМ ДОМЕНОМ КАЛИЕВОГО КАНАЛА KvAP <i>Петросян Н.С., Чугунов А.О., Парамонов А.С., Арсеньев А.С., Ефремов Р.Г., Шенкарев З.О.</i>	96

СЕКЦИЯ 6

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ИММУНИТЕТА

- 6.1 РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ MICA В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ
*Спелков А.А., Абакушина Е.В., Коваленко Е.И., Кузьмина Е.Г.,
Мушкарина Т.Ю., Стрельцова М.А., Каневский Л.М.* 97
- 6.2 ИЗУЧЕНИЕ МАЛЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ АКТИВИРОВАННЫХ
Т-ЛИМФОЦИТОВ ИЗ КРОВИ ДОНОРОВ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ
ПРОТИВ ВИРУСА ЖЁЛТОЙ ЛИХОРАДКИ
*Сычева А.Л., Погорельий М.В., Комеч Е.А., Звягин И.В.,
Мамедов И.З., Лебедев Ю.Б.* 98
- 6.3 НОВЫЙ МЕТОД ДЕТЕКЦИИ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА ПОВЕРХНОСТИ ЕДИНИЧНОЙ КЛЕТКИ
Украинская В.М., Степанов А.В., Белогуров А.А. 99
- 6.4 ВЛИЯНИЕ HSP70 НА ПРОЦЕССЫ ГИБЕЛИ В ПОПУЛЯЦИИ
НЕЙТРОФИЛОВ В МОДЕЛИ ИНДУЦИРОВАННОГО
АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ
Федорина А.С., Троянова Н.И., Сапожников А.М., Шевченко М.А. 100
- 6.5 КЛОНАЛЬНАЯ ДИНАМИКА ЭФФЕКТОРНОЙ СУБПОПУЛЯЦИИ
Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
*Фомченкова В.Е., Комеч Е.А., Сычева А.М., Масчан М.А.,
Звягин И.В., Лебедев Ю.Б.* 101

СЕКЦИЯ 7

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

- 7.1 СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЕ СТАРЕНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В КОНТЕКСТЕ mTOR
СИГНАЛИНГА
*Грюкова А.А., Бородкина А.В., Шатрова А.Н., Дерябин П.И.,
Бурова Е.Б.* 102
- 7.2 СТРЕССОВОЕ ВЛИЯНИЕ СУБ-ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ДОЗ
АНТИОКСИДАНТОВ НА ПРОЦЕСС САМООБНОВЛЕНИЯ
МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ
ЧЕЛОВЕКА
Корниченко Ю.С., Пуговкина Н.А., Люблинская О.Г. 103
- 7.3 ФРАГМЕНТАЦИЯ МИТОХОНДРИЙ ДРОЖЖЕЙ
Овченкова А.П., Голева Т.Н., Рогов А.Г. 104
- 7.4 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ
КЛЕТОК С НАТУРАЛЬНЫМ КИЛЛЛЕРАМИ
*Полтавцев А.М., Полтавцева Р.А., Гречихина М.В.,
Свирицкая Е.В.* 105

- 7.5 АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ТРАНСГЕННОГО ТЕТРАСПАНИНА CD63,
СШИТОГО С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ БЕЛКАМИ,
НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ЛИНИИ HeLa
Селенина А.В., Куличкова В.А., Томилин А.Н., Цимоха А.С. 106
- 7.6 НОВЫЙ МЕТОД АФФИННОЙ ОЧИСТКИ ЭКЗОСОМ НА ОСНОВЕ
МЕМБРАННЫХ МАРКЕРОВ CD9 И CD63
Федоров И.А., Цимоха А.С. 107
- 7.7 ВЛИЯНИЕ СИМУЛИРОВАННОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ НА
ПРОТЕОМ И МЕТАБОЛОМ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН РАПСА
(BRASSICA NAPUS)
*Чанцева В.В., Дидио А.В., Гришина Т.В., Илинг К., Хохенвартер В.,
Зинц А., Смоликова Г.Н., Фролов А.А., Медведев С.С., Билова Т.Е.* 108
- 7.8 МОДУЛЯЦИЯ ИНДУКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И
УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ ПРИ ДЕЙСТВИИ
ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
*Чуприянова Т.А., Колезова А.С., Попова А.А., Хмель И.А.,
Плюта В.А.* 109
- 7.9 ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОМА ARABIDOPSIS THALIANA В УСЛОВИЯХ
ЗАСУХИ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ
*Шумилина Ю.С., Паудель Г., Бергер Р., Балке Г.У., Биркемайер К.,
Вессйоханн Л.А., Фролов А.А., Гришина Т.В., Билова Т.Е.* 110

СЕКЦИЯ 8

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ

- 8.1 ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ
АЛЬБУМИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ СИСТЕМЫ ФЕНТОНА
Акинфиев В.С., Горобец М.Г., Бычкова А.В., Мисин В.М. 111
- 8.2 СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕДПОСАДОЧНОЙ
ОБРАБОТКИ СЕМЯН ОГУРЦА (CUCUMIS SATIVUS L.)
РЕГУЛЯТОРАМИ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ
Беленко Д.П. 112
- 8.3 СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ПРОДУЦЕНТА
ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТЕХНОЛОГИИ Crispr/Cas9
*Болотова А.А., Воробьева И.Г., Павленко Д.М., Корягина Т.Б.,
Степаненко В.Н.* 113
- 8.4 СИНТЕЗ КОНЬЮГАТА АНТИТЕЛО-ОЛИГОНУКЛЕОТИД
ПРИ ПОМОЩИ БИООРТОГОНАЛЬНОЙ КЛИК-РЕАКЦИИ
Воронина Д.В., Рязанцев Д.Ю. 114
- 8.5 МОДУЛИРУЕМЫЕ АКЦЕПТОРЫ ИНДУКТИВНО-РЕЗОНАНСНОГО
ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ НА ОСНОВЕ ЛИПОКАЛИНА B_{1c} И
СИНТЕТИЧЕСКИХ ХРОМОФОРОВ
Гавриков А.С., Лукьянов К.А., Мишин А.С. 115

- 8.6 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТА ЛЕНТИНАНА *LENTINUS EDODES* Led-10/MU НА МАТРИЦЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ
Гаврюшина И.А., Губайдуллин А.В., Кудрякова Г.Х. 116
- 8.7 УСЛОВИЯ ОБРАЗОВАНИЯ ДИМЕРОВ ПРАЙМЕРОВ В ПЦР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРАЙМЕРОВ "ВСТЫК"
Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р. 117
- 8.8 ЗЕЛЕННЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ С БОЛЬШИМ ВРЕМЕНЕМ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ
Горбачев Д.А., Саркисян К.С., Мишин А.С., Лукьянов К.А. 118
- 8.9 ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМНЫХ ФОРМ ФЛАВОЛИГНАНОВ СИЛИМАРИНА, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ХОЛЕСТЕРОЛОМ
Гудкова О.И., Кенда А.М., Ходжаева Р.Н., Мучкинова Е.А., Кудрякова Г.Х., Фельдман Н.Б. 119
- 8.10 ПОИСК НОВЫХ ПОДХОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КЛЕТОК ШТАММА *RHODOSPIRILLUM RUBRUM*
Егозарьян Н.С., Поливцева В.Н., Емельянова Е.В., Сузина Н.Е., Соляникова И.П. 120
- 8.11 ПОИСК НОВЫХ АНТИБИОПЛЕНОЧНЫХ АГЕНТОВ: НИКЛОЗАМИД
Журина М.В., Тетенева А.Н., Ганнесен А.В., Мартьянов С.В., Плакунов В.К. 121
- 8.12 РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕССИОННЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ТКАНЕВОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ ЯИЧНИКА КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА
Ильин И.С., Орлова Н.А., Воробьев И.И., Ковчир С.В., Ходак Ю.А. 122
- 8.13 НАНОРАЗМЕРНЫЕ КАПСУЛЫ НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ ИНКАПСУЛИРОВАННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА
Иноземцева О.А., Имамдинов А.Р., Бальшиева В.И., Марквичева Е.А. 123
- 8.14 РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФИТОПАТОГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПОТЕНЦИАЛЬНО ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ
Кабанова А.П., Ширишиков Ф.В., Баранник А.П., Во Тхи Нгок Ха, Шнейдер М.М., Иенатов А.Н., Мирошников К.А. 124
- 8.15 САЙТ-НАПРАВЛЕННОЕ ПЕГИЛИРОВАНИЕ scFv-ФРАГМЕНТОВ GD2-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ
Калиновский Д.В., Доронин И.И., Холоденко И.В., Молотковская И.М., Холоденко Р.В. 125
- 8.16 ВЛИЯНИЕ ПОЛИАМИНОВ НА АГРЕГАЦИЮ АЛЬФА-ЛАКТАЛЬБУМИНА, ИНДУЦИРУЕМУЮ ДИТИОТРЕИТОЛОМ
Кара Д.А., Борзова В.А., Маркосян К.А., Курганов Б.И. 126
- 8.17 СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ ВЫЗЫВАЕТ ФОРМИРОВАНИЕ IgG, НО НЕ СНИЖАЕТ УРОВЕНЬ IgE АНТИТЕЛ
Каширина Е.И., Чудаков Д.Б., Коцарева О.Д., Фаттахова Г.В., Свирицевская Е.В. 127
- 8.18 ИЗУЧЕНИЕ ДИССОЦИАЦИИ ОБОЛОЧКИ НЕБИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ
Ким А.Л., Тихоненко С.А., Мусин Е.В., Дубровский А.В. 128
- 8.19 ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ НА ГЕМОГЛОБИН И ДИНАМИКИ ЕГО ВЫХОДА ИЗ МИКРОКАПСУЛ В ПРОЦЕССЕ СОЗДАНИЯ ГАЗОТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ ЧЕЛОВЕКА
Ким А.Л., Тихоненко С.А., Мусин Е.В., Дубровский А.В. 129
- 8.20 ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ И РАДИКАЛЬНОГО СШИВАНИЯ БЕЛКОВ НА ПОВЕРХНОСТИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ
Лопухова М.В., Бычкова А.В., Милюткина А.Н., Данилова Т.А., Акинфиев В.С., Чикунова А.П., Пронкин П.Г., Розенфельд М.А. 130
- 8.21 ПОЛУЧЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИТОЗАНА С ФЕНОЛЬНЫМИ КИСЛОТАМИ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ
Луньков А.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Варламов В.П. 131
- 8.22 СОЗДАНИЕ БЕЛКОВЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОКОМПЬЮТЕРНЫХ СТРУКТУРАХ
Моисеев Я.П., Никитин М.П., Деев С.М. 132
- 8.23 РАЗРАБОТКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМ МНОГОКРАТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ
Мусин Е.В., Тихоненко С.А., Ким А.Л., Дубровский А.В. 133
- 8.24 ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ В РАМКАХ РАЗРАБОТКИ МЕДИЦИНСКИХ И ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРОДИАГНОСТИКУМОВ МНОГОКРАТНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
Мусин Е.В., Ким А.Л., Тихоненко С.А., Дубровский А.В. 134
- 8.25 ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ И КОМПОЗИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ МЕТОДОМ НАНОПРЕЦИПИТАЦИИ
Павлова Е.Р., Морозова О.В., Багров Д.В., Клинов Д.В. 135
- 8.26 ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ МЕЧЕНИЕ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ, ОПОСРЕДОВАННОЕ ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИЕЙ ИСКУССТВЕННЫХ АЛЬФА-СПИРАЛЕЙ
Перфилов М.М., Гурская Н.Г., Клементьева Н.В., Мишин А.С., Лукьянов К.А. 136
- 8.27 ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ШТАММА МИКРОВОДОРОСЛИ - ПЕРСПЕКТИВНОГО ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОДУЦЕНТА ФУКОКСАНТИНА
Петрушкина М.А., Мамаева А.С., Сорокин Б.А., Филимонова А.В., Зотько Н.С., Намсараев З.Б., Кузьмин Д.В. 137

8.28	РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ИММУНО-ПЦР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА Е К КЛЕЩАМ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ И ПЛЕСЕНИ <i>Пивоваров В.Д., Симонова М.А., Рязанцев Д.Ю.</i>	138
8.29	ВЛИЯНИЕ ТОКСИН-АНТИТОКСИНОВОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЭЛЕМЕНТА НА УРОВЕНЬ И ДИНАМИКУ БИОСИНТЕЗА ИНТЕРФЕРОНА β ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ <i>E.COLI</i> <i>Пискарева А.А., Орлова Н.А., Ходак Ю.А., Воробьев И.И.</i>	140
8.30	ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ СЕНСОР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗЫ) В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ <i>Подвальная Н.М., Серебровская Е.О., Шрам С.И., Лукьянов К.А.</i> ..	141
8.31	ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ СРЕДЫ И РАЗМЕРА МОЛЕКУЛ ДНК НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИХ ФРАГМЕНТАЦИИ УЛЬТРАЗВУКОМ <i>Рахматуллина А.И., Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р.</i>	142
8.32	СОЗДАНИЕ РАЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИНДИКАТОРА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМОГО СЕНСОРА NeonOxЕ <i>Ревазян А.С., Ермакова Ю.Г., Белоусов В.В.</i>	143
8.33	ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ИММУНОГЛОБУЛИНА А В КЛЕТКАХ СНО <i>Рыбченко В.С.</i>	144
8.34	РАЗРАБОТКА АПТАМЕРНОГО ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А <i>Самохвалов А.В., Сафенкова И.В., Еремин С.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.</i>	145
8.35	РАЗВЕТВЛЕННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 5-(ПЕРИЛЕН-3-ИЛЭТИНИЛ) УРАЦИЛ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ <i>Сапожникова К.А., Брылёв В.А., Стрешнев Ф.П., Чистов А.А., Коршун В.А.</i>	146
8.36	РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОРХИДНЫХ (<i>ORCHIDACEAE</i>) ЦЕНТРАЛЬНО-ЕВРОПЕЙСКОЙ РОССИИ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> <i>Сидоров А.В., Сечин Е.Н., Зайцева Ю.В., Маракаев О.А.</i>	147
8.37	БИОГЕНЕЗ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ <i>Сидорова Д.Е., Кокшарова О.А., Попова А.А., Плюта В.А., Хмель И.А.</i>	148
8.38	ПРОДУКТЫ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ ИЗ ХИТОЗАНОВЫХ ГЕЛЕЙ С ПОВЫШЕННОЙ МЕХАНИЧЕСКОЙ ПРОЧНОСТЬЮ <i>Сочилина А.В., Простякова А.И., Вихров А.А.</i>	149

8.39	ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ НОВЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ 2-АМИНОБЕНЗИМИДАЗОЛА <i>Степанов М.Р., Харитонова М.И.</i>	150
8.40	СЕЛЕКЦИЯ ПЕРСПЕКТИВНОГО ПРОДУЦЕНТА ПАЛЬМИТОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ <i>Степанова Н.Н., Моргунов И.Г.</i>	151
8.41	АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ПАНЦИРЕЙ И ИГЛ ЗЕЛЁНЫХ МОРСКИХ ЕЖЕЙ <i>STRONGYLOCENTROTUS DROBACHIENSIS</i> <i>Терёхина Я.А., Пожарицкая О.Н.</i>	152
8.42	УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПОБОЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНОМ СИНТЕЗЕ 2-ФТОР-КОРДИЦЕПИНА И РАЗРАБОТКА ВАРИАНТА СПОСОБА ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ <i>Токунова Ю.А.</i>	153
8.43	РАЗРАБОТКА НОВЫХ БИОПРЕПАРАТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩЕЙ И МИКОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЯМИ <i>Фунтикова Т.В.</i>	155
8.44	ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСТРАКТА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАЛАНХОЭ (<i>KALANCHOE PINNATA</i>), ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ИСКУССТВЕННЫЙ ГЕН АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ЦЕКРОПИНА Р1 <i>Фурс О.В., Захарченко Н.С., Пиголева С.В., Шевчук Т.В., Дьяченко О.В., Бурьянов Я.И.</i>	156
8.45	СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОКЛАСТЕРОВ СЕРЕБРА, КОНЪЮГИРОВАННЫХ С БЕЛКОМ <i>Шайбакова И.Д., Лазарев В.Н., Баринов Н.А., Клинов Д.В.</i>	157
8.46	ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СРАВНЕНИЕ ERVb2-СПЕЦИФИЧНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ miniSOG <i>Шилова О.Н., Прошкина Г.М., Деев С.М.</i>	158
8.47	РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ФОРМЫ ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ <i>THERMUS THERMOPHILUS</i> <i>Яренчук А.С., Степаненко В.Н., Константинова И.Д., Тюрин О.В., Смирнова О.С.</i>	159

СЕКЦИЯ 9

БИОМЕДИЦИНСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1	ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОРФИРАЗИНОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫХ СТРУКТУР ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ <i>Бармин Р.А., Неганова М.Е., Тараканов П.А., Мищенко Д.В.</i>	160
-----	--	-----

9.2	БЕЛКИ ЧЕЛОВЕКА SLURP-1 И SLURP-2 - ПРИРОДНЫЕ ЗАЩИТНИКИ ОТ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕТОК <i>Бычков М.Л., Ефременко А.В., Бойко А.А., Шаронов Г.В., Шулепко М.А., Феофанов А.В., Люкманова Е.Н., Долгих Д.А.</i> 161	9.12	УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ POU3 В ПЛАЦЕНТАРНОЙ ТКАНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ <i>Обухова Е.А., Боровков И.М., Дамулин В.И., Боровкова Е.И., Антипова Н.В.</i> 171
9.3	КОМПОЗИЦИОННЫЕ КОВАЛЕНТНО СШИТЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ <i>Водякова М.А., Балабанова Т.В., Дроздова М.Г., Маслова М.В., Касаткина М.А., Демина Т.С., Успенский С.А., Кильдеева Н.Р., Марквичева Е.А.</i> 162	9.13	IN VIVO МОДЕЛЬ ОСТРОГО ПЕРОРАЛЬНОГО АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНОГО ОТРАВЛЕНИЯ <i>Паликов В.А., Паликова Ю.А., Белоус Г.И., Смирнов И.В., Дьяченко И.А., Мурашев А.Н.</i> 172
9.4	ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК ЧЕЛОВЕКА В СИСТЕМЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ EX VIVO <i>Воробьева Д.А., Лебедева А.М., Вагида М.С., Иванова О.И., Фелькер Е.И., Гонтаренко В.Н., Шпектор А.В., Марголис Л.Б., Васильева Е.Ю.</i> 163	9.14	ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛИПЕПТИДНОГО АНАЛЬГЕТИКА, СЕЛЕКТИВНО ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩЕГО С ПУРИНЕРГИЧЕСКИМИ РЕЦЕПТОРАМИ <i>Паликова Ю.А., Паликов В.А., Белоус Г.И., Андреев Я.А., Дьяченко И.А., Мурашев А.Н.</i> 173
9.5	ПОЛУЧЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ АПКОНВЕРТИРУЮЩИХ НАНОФОСФОРОВ <i>Демина П.А., Хайдуков Е.В., Шолина Н.В., Рочева В.В., Хоченков Д.А., Нечаев А.В., Генералова А.Н.</i> 164	9.15	ВЫЯСНЕНИЕ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ, ОПОСРЕДУЮЩИХ РАЗВИТИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНСУЛИНУ, В МОДЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЭНДОТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА <i>Палкина К.А.</i> 174
9.6	МЕТОД ОДНОСТАДИЙНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ОБРАЗЦОВ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ДЛЯ ПЦР-АНАЛИЗА <i>Зыбин Д.И., Простякова А.И., Ищенко А.А., Капустин Д.В.</i> 165	9.16	ВЛИЯНИЕ ФИТОПРЕПАРАТОВ НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В АДИПОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ <i>Панова А.В., Черноруцкий М.В.</i> 175
9.7	ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ЧЕЛОВЕКА <i>Иванова М.А., Кошкин С.А., Толкунова Е.Н.</i> 166	9.17	ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ НАДФН-ОКСИДАЗ ПРИ АДИПОЦИТАРНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ <i>Подкуйченко Н.В., Воротников А.В., Стафеев Ю.С.</i> 176
9.8	ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ПРОЛИН-БОГАТЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ <i>Калашиников А.А., Болосов И.А., Баландин С.В., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В.</i> 167	9.18	ИЗУЧЕНИЕ ЛИТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА <i>LYSOBACTER CAPSICI</i> ВКМВ-2533 <i>Протас К.Г., Васильева Н.В.</i> 177
9.9	РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЭЖХ-ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ <i>Козлов И.А., Ищенко А.А., Капустин Д.В.</i> 168	9.19	ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАФИК КАТИОННЫХ И АНИОННЫХ ЛИПОСОМ <i>Рябухина Е.В., Ярославов А.А., Сыбачин А.В., Свирицевская Е.В.</i> .. 178
9.10	СИНТЕЗ НОВОГО ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОГО ПРОИЗВОДНОГО ИНГИБИТОРА ОБРАТНОГО ЗАХВАТА ДОФАМИНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИМИ КЛЕТКАМИ <i>Лаврова А.В., Акимов М.Г., Мингазов Э.Р., Грецкая Н.М.</i> 169	9.20	СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СИСТЕМ ДОСТАВКИ РЕПОРТЕРНОЙ ПЛАЗМИДЫ IN VITRO И IN VIVO <i>Санков В.А., Коновалова М.В., Гречихина М.В., Есипов Р.С., Свирицевская Е.В.</i> 179
9.11	ПОЛИСАХАРИДНЫЕ МИКРОКОНТЕЙНЕРЫ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ ДОСТАВКИ ПРОТИВОРАКОВЫХ ЛЕКАРСТВ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ В МОДЕЛИ IN VITRO <i>Лысова Е.Ю., Гилёва А.М., Акасов Р.А., Букреева Т.В., Бородин Т.Н., Марквичева Е.А.</i> 170	9.21	ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ДОФАМИНАМИДА БЕКСАРОТЕНА ДЛЯ ЛИНИИ КЛЕТОК КРЫСИНОЙ ГЛИОМЫ С6 <i>Силкина Н.И., Акимов М.Г., Грецкая Н.М., Безуглов В.В.</i> 181
		9.22	СИНТЕЗ НОВЫХ ОМЕГА-ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ НЕЙРОЛИПИНОВ <i>Солдатова Я.А., Акимов М.Г., Грецкая Н.М.</i> 182
		9.23	ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ И ПОЛИПЕПТИДОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ ПРОТИВОРАКОВЫХ АГЕНТОВ В КЛЕТКИ <i>Хованкина А.В., Трушина Д.Б., Акасов Р.А., Букреева Т.В., Марквичева Е.А.</i> 183

9.24	РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ ГЛИКИРОВАННЫХ БЕЛКОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МАКРОФАГОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ <i>Чекина А.А., Вихнина М.В., Соболева А., Гришина Т.В., Смоликова Г.Н., Фролов А.А., Медведев С.С., Романовская Е.В.</i>	184
9.25	СИНТЕЗ И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕНУКЛЕОЗИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПЕРИЛЕНА <i>Чистов А.А., Малков А.А., Стрешнев Ф.П., Кориун В.А.</i>	185
9.26	СИСТЕМА ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ЭЛИМИНИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА miniSOG, АКТИВИРУЕМОГО БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ РЕЗОНАНСНЫМ ПЕРЕНОСОМ ЭНЕРГИИ <i>Шрамова Е.И., Прошкина Г.М., Деев С.М.</i>	186
9.27	УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ <i>POM1</i> В ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ МЫШЕЙ ЛИНИИ СВРВ <i>Яненко Б.В., Антипова Н.В., Моисеева Е.В., Аронов Д.А., Шахпаронов М.И.</i>	187
	АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	188
	СОДЕРЖАНИЕ	195