

«УТВЕРЖДАЮ»

постановление бюро ОБН РАН

от \_\_\_\_\_ 2014 года № \_\_\_\_\_

Академик-секретарь

Отделения биологических наук РАН

академик А.Ю.Розанов

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук**

## **ОТЧЕТ**

**О ВЫПОЛНЕНИИ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ  
РАБОТ ЗА 2013 г.**

Отчет утвержден на заседании  
Ученого совета ИБХ РАН  
18 декабря 2013 г., протокол № 10

Директор ИБХ РАН  
академик В.Т.Иванов



Москва  
2013г.

## Содержание

	Стр.
I. Важнейшие результаты исследований, завершенных в 2013 году	3
II. Научная и научно-организационная деятельность в 2013 г.	26
III. Инновационная деятельность	33
IV. Патентная деятельность	34
V. Сведения о выполнении научно-исследовательских работ отделениями РАН по областям и направлениям науки в 2013 г. (таблица 1)	39
VI. Индикатор эффективности реализации Программы (таблица 2)	67
VII. Исследования, проводимые в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы (таблица 3)	68
VIII. Исследования, проводимые по научным направлениям Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы за счет внебюджетных источников (таблица 4)	69
IX. Сведения о результатах, достигнутых за отчетный период по темам в рамках фундаментальных научных исследований, предусмотренных Планом Института к выполнению в 2013 г. (по направлениям).	71

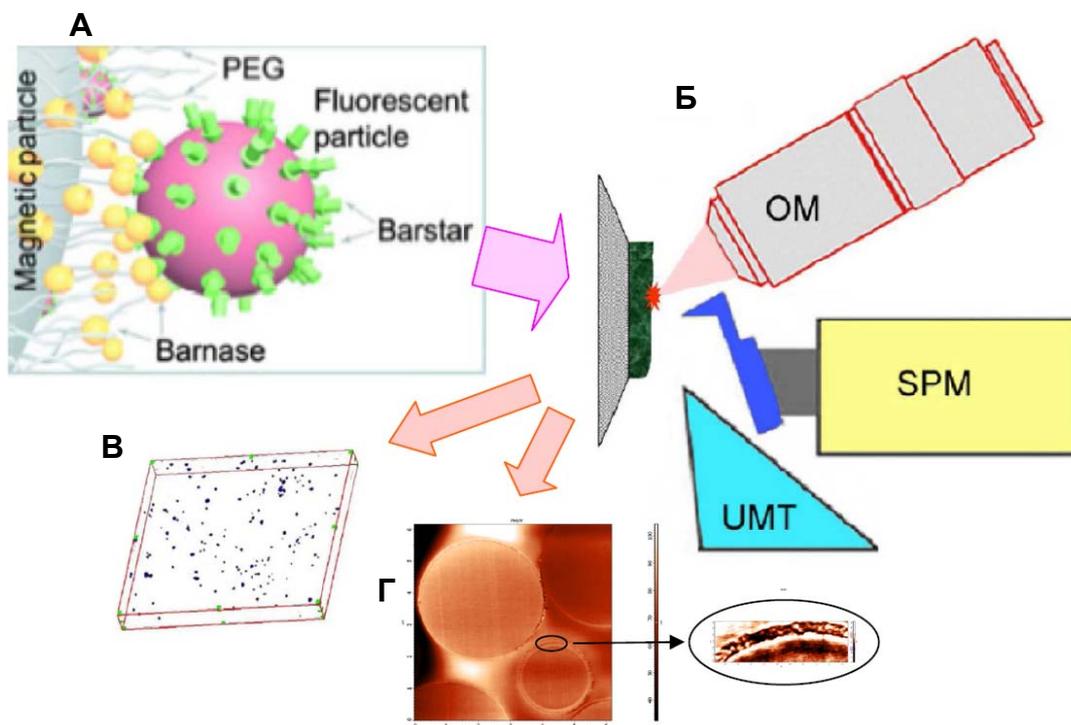
# I. Важнейшие результаты исследований, завершенных в 2013 году

## 1. Лаборатория молекулярной иммунологии (рук. Деев С.М.) и лаборатория молекулярной биофизики (рук. В.А. Олейников)

**Макро-микро-нано:** создана платформа для разработки многофункциональных наноструктур и инструментария для их регистрации. Разработка включает наносистемы для адресной доставки агентов для диагностики и терапии на основе нано- и микрочастиц, содержащих распознающие, визуализирующие и лекарственные агенты, и инструментарий для получения 3-D распределения и 3-D структуры наносистем и их идентификации с использованием комплекса нанотехнологических методов, включающих атомно-силовую микроскопию, оптическую микроспектроскопию и нанотомографию.

*Впервые с помощью белок-опосредованной нековалентной самосборки получены коллоидные бифункциональные (флуоресцентные и магнитные) нано- и микрочастицы, обладающие исключительной устойчивостью к экстремальным для белков денатурирующим условиям. Разрабатываемая технология белок-опосредованной нековалентной самосборки мультифункциональных коллоидных нано- и микрочастиц предназначена для создания нового поколения тера(г)ностических агентов.*

*Совместно с Институтом трансплантологии и искусственных органов им. В.И. Шумакова и НИЯУ «МИФИ» создан новый подход, основанный на объединении трех наноинструментальных методов: сканирующей зондовой микроскопии, оптической микроспектроскопии и ультратомографии. Экспериментальная реализация нового подхода является прообразом нового класса инструментов, позволяющих получать информацию о структурных и оптических свойствах нано- и микрочастиц и их распределения в биологических объектах.*



- А** - Схема самосборки многофункциональной наночастицы с помощью молекулярного адаптора барназа-барстар;
- Б** – схема инструмента, объединяющего методы оптической микроспектроскопии (**OM**); сканирующей зондовой микроскопии (**SPM**) и ультратомографии (**UMT**);
- В** – реконструкция 3D-распределения микрочастиц;
- Г** – сечение микрочастицы с включенными в приповерхностный слой наночастицами.

Разработана технология получения мультифункциональных надмолекулярных комплексов на основе нано- и микро-суперструктур путем самосборки функциональных модулей различной природы с помощью различных молекулярных адаптеров, базирующихся на белок-белковых взаимодействиях (барназа/барстар; стрептавидин/конъюгат биотина с антителами; антитело/антиген; белок A/IgA). Впервые путем такой белок-опосредованной самосборки полистирольных микро- и наночастиц двух типов получены бифункциональные, одновременно магнитные и флуоресцентные, коллоидные микро- и наноконструкции. Проведено детальное исследование их устойчивости в широком диапазоне условий: pH, температура, ионная сила, присутствие хаотропных агентов, ультразвуковое воздействие. Продемонстрировано, что системы нековалентной самосборки, в которых участвуют гибридные функциональные элементы – конъюгаты коллоидных частиц с белками, необычно стабильны и выдерживают экстремальные для молекул белков денатурирующие условия. Сравнение системы барназа-барстар с другими системами самосборки на основе белок-белковых взаимодействий показало ее значительное преимущество при сборке надмолекулярных структур в жестких условиях

Созданный новый подход основан на объединении трех наноинструментальных методов: сканирующей зондовой микроскопии, оптической микроспектроскопии и ультратомографии. Метод позволяет реконструировать трехмерное изображение образца неограниченной толщины с высоким пространственным разрешением (нанометровый диапазон) и получать спектрально-оптические данные от локальных областей образца. Экспериментальная реализация нового подхода является прообразом нового класса инструментов, позволяющих получать информацию о структурных и оптических свойствах локальных областей нанометрового диапазона, нано- и микро- суперструктур, их распределении в локальных областях биологических объектов.

В целом, разработанный взаимно дополняющий комплекс из нового типа нано-, микроструктур и макроинструментов для их регистрации, идентификации и анализа, позволяет сделать новый шаг в изучении свойств наноразмерных объектов и материалов: наноструктурированных поверхностей, нанокомпозитов, наночастиц, биологических и медицинских объектов.

Aghayeva U.F., Nikitin M.P., Lukash S.V., Deyev S.M. (2013) Denaturation-resistant bifunctional colloidal superstructures assembled via the proteinaceous barnase-barstar interface. *ACS Nano*, 2013, 7(2), 950-961;

Mochalov K.E., Efimov, A.E., Bobrovsky A., Agapov, I.I., Chistyakov A.A., Oleinikov V., Sukhanova A., Nabiev I. (2013) Combined Scanning Probe Nanotomography and Optical Microspectroscopy: A Correlative Technique for 3D Characterization of Nanomaterials. - *ACS Nano*, 7(10), 8953-8962.

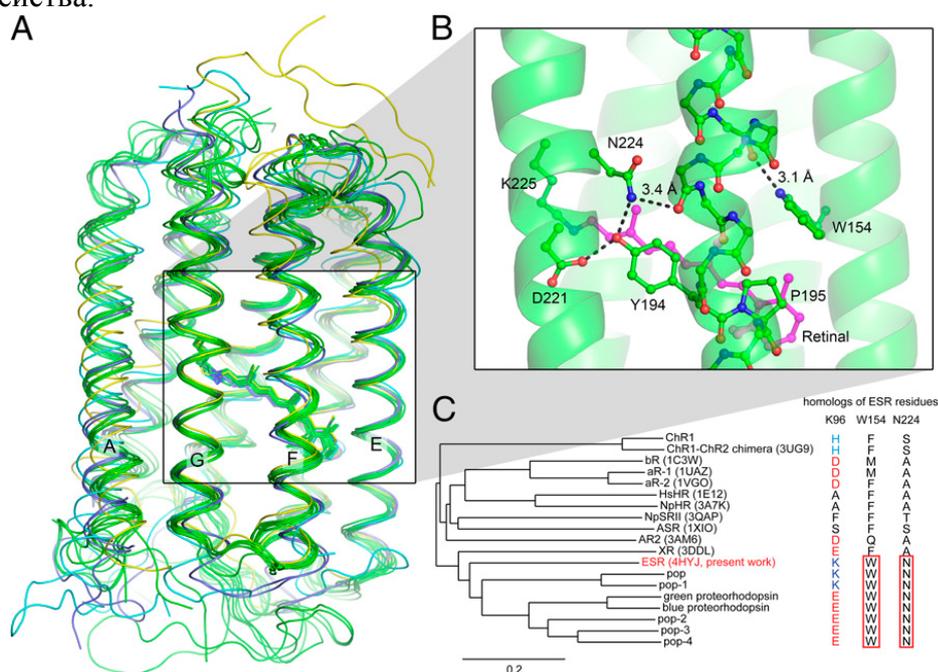
Generalova A.N., Sizova S.V., Zdobnova T.A., Zarifullina M.M., Artemyev M.V., Baranov A.V., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Deyev S.M. Submicron polymer particles containing fluorescent semiconductor nanocrystals CdSe/ZnS for bioassays. – *Nanomedicine*, 2011, 6(2), 195-209.

## **2. Отдел биоинженерии (рук. Кирпичников М.П.)**

**Совместно с лабораторией биомолекулярной ЯМР спектроскопии с участием кафедры биофизики Биологического факультета МГУ, Отдела физиологии и биофизики Университета Калифорнии, Ирвайн, и Института структурной биологии, Гренобль.**

*Проведены структурно-функциональные исследования и расшифрована пространственная структура бактериородопсина *Exiguobacterium sibiricum* – нового уникального представителя семейства ретиналь-содержащих белков, осуществляющих трансмембранный перенос протонов.*

Проведено клонирование гена бактериородопсина *Exiguobacterium sibiricum* (ESR), разработаны система его функциональной продукции в мембране клеток *Escherichia coli* и бесклеточная система экспрессии в присутствии различных мембраномоделирующих сред. Проведено изучение фотоцикла ESR и его мутантных вариантов. Установлено, что донором протонов для основания Шиффа в молекуле ESR является остаток лизина Lys 96, а протон-акцепторный участок включает сопряженные остатки His 57 и Asp 85. Методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 2.3 Å расшифрована пространственная структура ESR – первая в мире пространственная структура ретиналь-содержащего белка зубактерий, не содержащего дополнительного хромофора. Обнаружено нарушение  $\alpha$ -спиральной структуры в сегменте F, включающее  $3_{10}$  и  $\pi$ -спиральные элементы. Эта особенность предположительно является характерной для протеородопсинов, что позволяет использовать полученную структуру в качестве модели для изучения других белков семейства.



Сравнение пространственной структуры ESR и других ретиналь-содержащих белков. Крупно показан участок сегмента F, содержащий  $3_{10}$  и  $\pi$ -спиральные элементы

Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Imasheva E.S., Lukashev E.P., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. Breaking the Carboxyl Rule: Lysine-96 Facilitates Reprotonation of the Schiff Base in the Photocycle of a Retinal Protein from *Exiguobacterium sibiricum*. *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288, p. 21254-21265.

Dioumaev A.K., Petrovskaya L.E., Wang J., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. Photocycle of *Exiguobacterium sibiricum* Rhodopsin Characterized by Low-Temperature Trapping in the IR and Time-Resolved Studies in the Visible. *J. Phys. Chem. B.* 2013. V. 117, p. 7235-7253.

Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N., Butenko I.O., Petrovskaya L.E., Paramonov A.S., Shulepko M.A., Nekrasova O.V., Kirpichnikov M.P., Arseniev A.S. Lipid-protein nanodiscs promote in vitro folding of transmembrane domains of multi-helical and multimeric membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V.1828, p. 776-784.

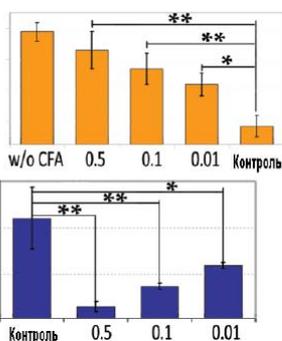
Gushchin I., Chervakov P., Kuzmichev P., Popov A., Round E., Borshchevskiy V., Ishchenko A., Petrovskaya L., Chupin V., Dolgikh D., Arseniev A., Kirpichnikov M., Gordeliy V. Structural insights into the proton pumping by unusual proteorhodopsin from nonmarine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110, p. 12631-12636.

### 3. Лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов (рук. Гришин Е.В.)

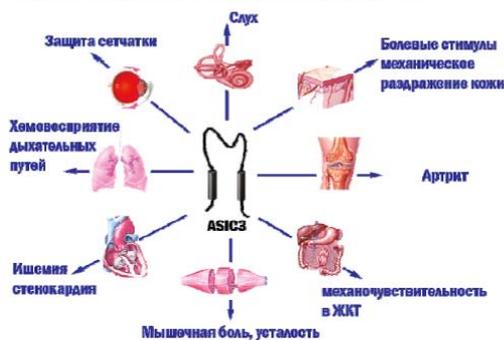
**В нематоцистах морской актинии обнаружен уникальный пептидный анальгетик, проявляющий ингибирующую активность в отношении протонактивируемых каналов ASIC3.**



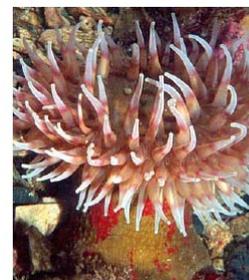
Измеренная пространственная структура полипептида



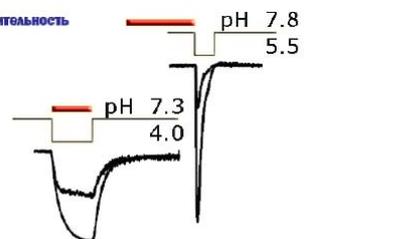
Рецепторы ASIC3 играют важную роль в физиологических и патологических процессах



Пептид из актинии эффективно снижает болевую чувствительность у мышей в различных моделях воспалительной и острой боли



Арктический вид морских анемонов *Urticina grebelnyi*



Полипептид из актинии специфично ингибирует обе составляющие интегрального тока ASIC3 рецептора в электрофизиологических экспериментах

Из нематоцистов актинии *Urticina grebelnyi* выделен пептид Ugr 9-1, вызывающий 100 % ингибирование быстрой компоненты, а также неполное подавление медленной компоненты токов через протонактивируемые ASIC3 каналы. Установлена структура пептида, содержащего 29 аминокислотных остатков, а также уникальная структура его гена-предшественника. Разработан способ получения рекомбинантного пептида Ugr 9-1 в бактериальной системе экспрессии. Методами ЯМР установлена уникальная пространственная структура рекомбинантного Ugr 9-1, представляющая собой «уплощенную»  $\beta$ -шпильку с пятью  $\beta$ -поворотами, стабилизированную 2 дисульфидными и 8 водородными связями. Биологическая активность Ugr 9-1 изучена в тестах на животных, основанных на измерении анальгетического эффекта при воспалительных реакциях, в которых немаловажный вклад в восприятие боли вносят ASIC3 каналы. Показано, что Ugr9-1 в дозах 0,1 и 0.5 мг/кг в значительной мере ослабляет тепловую гиперчувствительность, вызванную введением воспалительного агента, а также вызывает снижение ответа более чем на 40% в тесте кислотной стимуляции боли. Морфин, известный своими анальгетическими и наркотическими свойствами, демонстрировал в данных тестах схожие результаты в дозах 1-5 мг/кг. Таким образом, пептид Ugr 9-1 обладает обезболивающим эффектом при физиологически допустимых концентрациях, значения которых на порядок меньше, чем для известных обезболивающих препаратов, применяемых в медицинской практике.

Osmakov DI, Kozlov SA, Andreev YA, Koshelev SG, Sanamyan NP, Sanamyan KE, Dyachenko IA, Bondarenko DA, Murashev AN, Mineev KS, Arseniev AS, Grishin EV. Sea anemone peptide with uncommon  $\beta$ -hairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity. *J Biol Chem.* 2013, 288(32):23116-23127.

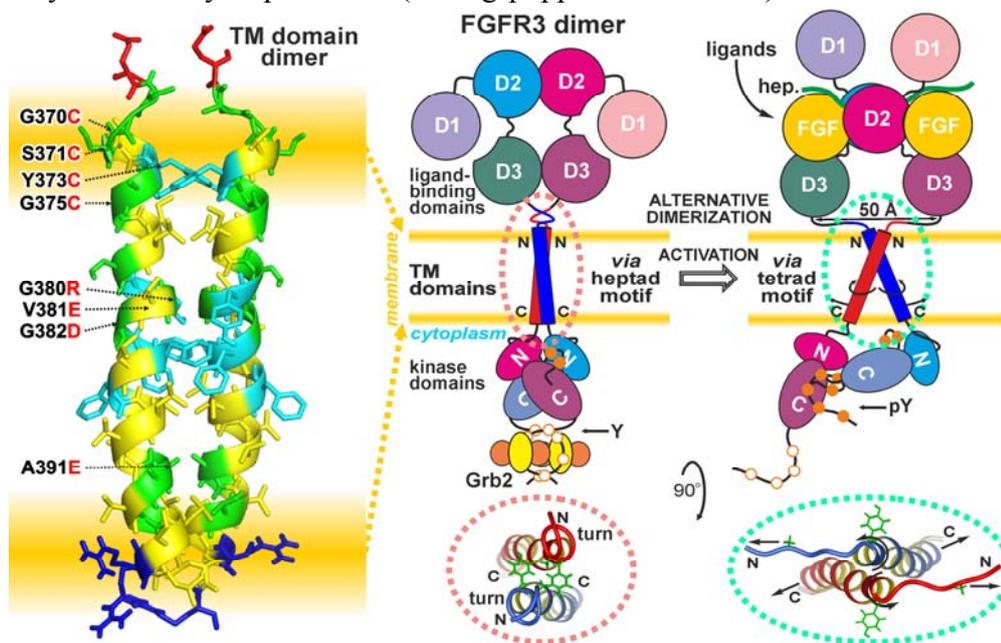
# Достижения ИБХ РАН в 2013 году

## Лаборатория биомолекулярной ЯМР спектроскопии (рук. Арсеньев А.С.)

*На примере FGFR3 из семейства рецепторов факторов роста фибробластов проведен анализ белок-белок и белок-липид взаимодействий для ТМ домена, получена пространственная структура ТМ домена и исследованы конформационные изменения при его ассоциации. Предложен механизм активации FGFR3 в норме и при патологиях.*

Одно из перспективных направлений в структурной биологии являются исследования мембранных белков – изучение механизма функциональной димеризации битопных мембранных белков и конструирование активных веществ, для адекватной терапии социально-значимых заболеваний.

Получены  $^{15}\text{N}$  и  $^{13}\text{C}$  меченые препараты, соответствующие ТМ домену белка рецепторной тирозинкиназы FGFR3. Установлена пространственная структура гомодимера FGFR3tm (Рис. 1) - симметричный димер с левой сверхспирализацией параллельных  $\alpha$ -спиралей. Димер стабилизирован контактами Ван-дер-Ваальса между остатками Leu и Ile и стэкинг-взаимодействием Phe и Tyr.  $\alpha$ -Спирали взаимодействуют по “семичленному” мотиву  $\text{YA}^{374}\text{X}_2\text{L}^{377}\text{X}_2\text{G}^{380}\text{X}_2\text{FF}^{384}\text{X}_2\text{IL}^{388}\text{X}_2\text{A}^{391}\text{X}_2\text{TL}^{395}$ , на котором расположены 3 известные патогенные мутации Tyr373Cys (проонкоген), Gly380Arg (ахондроплазия), Ala391Glu (синдром Крузона, проонкоген). Альтернативный тандемный GG4-мотив  $\text{A}^{574}\text{X}_3\text{S}^{378}\text{X}_3\text{G}^{380}$ , предсказанный молекулярным моделированием, предполагает правозакрученную ассоциацию ТМ спиралей FGFR3, аналогичную РТК ErbB в активном состоянии рецептора. Сопоставления с литературными данными показали, что, активация РТК семейства FGFR может происходить по вращательно-сцепленному механизму марионетки (“string-puppet mechanism”).

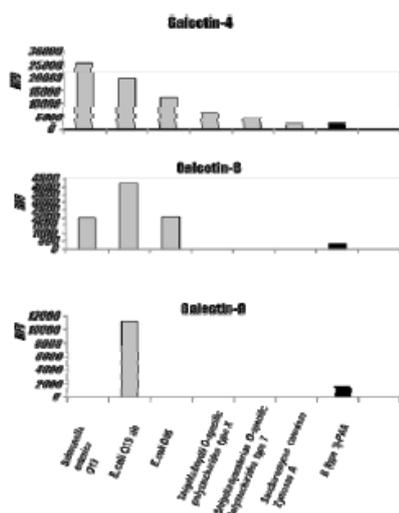


ЯМР структура димера ТМ домена FGFR3 (с указанием патогенных мутаций) и предложенный механизм активации РТК FGFR3 в мембране клетки.

## Лаборатория углеводов (рук. Бовин Н.В.)

### *Обнаружена способность галектинов узнавать молекулярные паттерны бактериальных полисахаридов.*

Галектины известны как белки, узнающие  $\beta$ -галактоза-терминированные углеводные цепи гликопротеинов и гликолипидов. С помощью микроэррея, содержащего 150 бактериальных полисахаридов (ПС), мы показали, что галектины-4, -8 и -9 способны связываться с несколькими бактериальными ПС (Рис.), структура которых приведена в Таблице.



галектины -4, -8 и -9 способны связываться с несколькими бактериальными ПС

Бактерия/Повторяющееся звено ее липополисахарида
<i>Salmonella enterica</i> O13 [-2)Fucal-2Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-3GlcNAc(1-)] <sub>n</sub>
<i>E. coli</i> O19 ab [-2)Rhaa1-2Rhaa1-2Rhaa1-2Glc $\beta$ 1-3GlcNAc6Ac $\beta$ (1-)] <sub>n</sub>
<i>E. coli</i> O86 [-2)Gala1-3(Fuca1-2)Gal $\beta$ 1-3GalNAca1-3GalNAc $\beta$ (1-)] <sub>n</sub>
<i>Shigella boydii</i> type X [-3)GlcNAc $\beta$ 1-2(Glca1-3)Rhaa1-2Rhaa1-3Rhaa(1-)] <sub>n</sub>
<i>Shigella dysenteriae</i> type 7 [-3)GalNAcaA3Ac6NH <sub>2</sub> a1-4GalNAcaA1-3GlcNAc-(1-)] <sub>n</sub>

бактериальные полисахариды (ПС)

Факт связывания этих галектинов с ПС из *Salmonella enterica* O13 и из *E. coli* O86ab не удивителен, так как их структура почти идентична структуре гликанов системы групп крови АВН, с которыми галектины-4, -8 и -9 хорошо взаимодействуют на поверхности клетки (Е.М.Рапопорт и соавт., *Glycobiology*, 2012). В то же время, структура остальных трех ПС не имеет ничего общего ни с гликанами системы АВН, ни с  $\beta$ -галактозидами. Мы объясняем факт необычной специфичности галектинов тем, что они узнают в составе полисахаридов не линейные (как в случае относительно гибких гликанов в гликопротеинах и гликолипидах), а конформационно-сближенные участки витков спирали жестких ПС. Мы предполагаем, что в составе целых бактерий возможно узнавание галектинами молекулярных паттернов, составленных из соседних ПС цепей; если это подтвердится, то галектины становятся еще одним звеном врожденного противобактериального иммунитета.

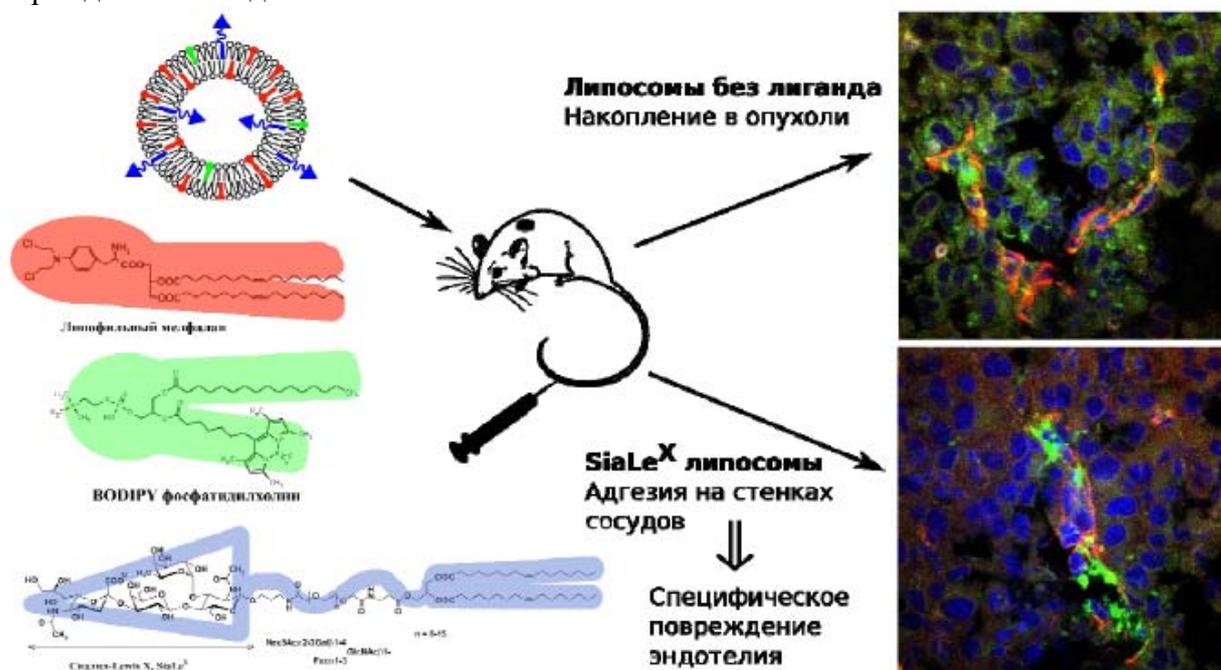
Y.A.Knirel, H.-J.Gabius, O.Blixt, E.M.Rapoport, N.R.Khasbiullina, N.V.Shilova, N.V.Bovin. Humantandem-repeatypegalactinsbindbacterialnon- $\beta$ Galpolysaccharides. *Glycoconj.J.*, ... (2013). PMID:24065176

**Лаборатория химии липидов  
(рук. Водовозова Е.Л.)**

**Совместно с лабораторией углеводов ИБХ РАН и Российским онкологическим научным центром им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**

***Липосомы с липофильным пролекарством и тетрасахаридным лигандом селектинов SiaLe<sup>X</sup> направлены на эндотелий сосудов опухоли***

Показано *in vivo* (на модели карциномы легких Льюис), что противоопухолевый эффект 100-нм липосом, сконструированных на основе природных фосфолипидов и липофильного пролекарства мелфалана, и несущих тетрасахаридный лиганд селектинов сиалил-Льюис X (SiaLe<sup>X</sup>), обусловлен специфическим антивазкулярным эффектом в ткани опухоли. В отсутствие адресного лиганда липосомы накапливаются в опухолевой ткани за счет пассивного транспорта, в то время как введение углеводного конъюгата обеспечивает их активный транспорт к эндотелию опухолевых сосудов, вызывая специфическое повреждение последних.



N.R. Kuznetsova, E.V. Stepanova, N.M. Peretolchina, D.A. Khochenkov, I.A. Boldyrev, N.V. Bovin, E.L. Vodovozova. Targeting liposomes loaded with melphalan prodrug to tumour vasculature via the Sialyl Lewis X selectin ligand. *J. Drug Targeting* 2014 in press (doi:10.3109/1061186X.2013.862805)

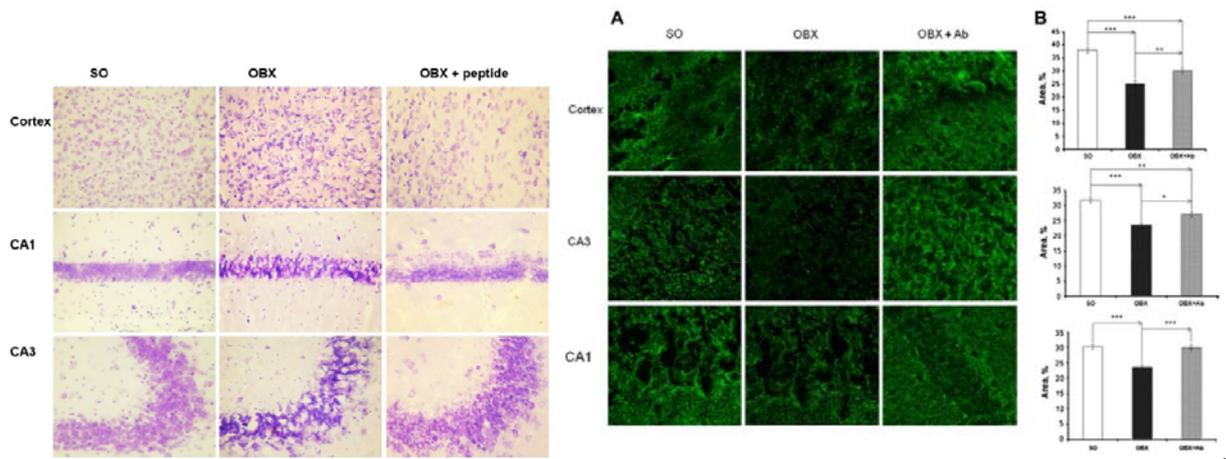
**Лаборатория химии липидов  
(рук. Водовозова Е.Л.)**

**Совместно с университетами Миннесоты и Вирджинии США, и др.**

***С помощью флуоресцентных сфинго- и фосфолипидов функций вновь открытого переносящего церамид-1-фосфат (C1P) белка (C1P) показано, что C1P модифицирует активность фосфолипазы A2 и тем опосредует биосинтез эйкозаноидов***

С применением набора флуоресцентномеченых фосфо- и гликолипидов, в сотрудничестве с коллективом, возглавляемым проф. Р.Брауном (Институт им. Хормеля, США), исследованы функции вновь открытого церамид-1-фосфат-переносящего белка (C1P),





### Морфофункциональное состояние нейронов

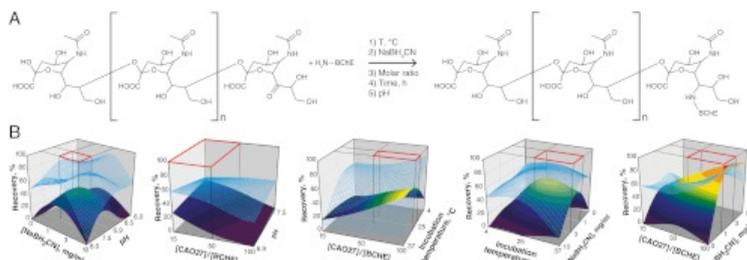
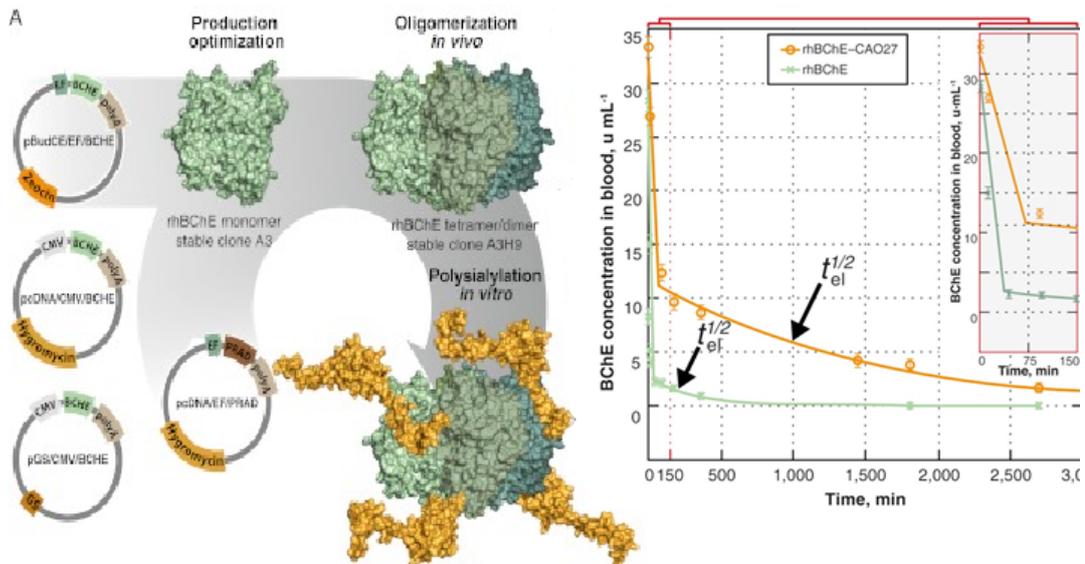
SO-контрольные животные, OBX-бульбэктомированные мыши с нейродегенерацией альцгеймеровского типа, OBX + peptide это бульбэктомированные мыши, иммунизированные пептидом

### Синаптическая плотность нейронов.

Также, как и на предыдущем рисунке, SO-контрольные животные, OBX-бульбэктомированные мыши, OBX + Ab, это бульбэктомированные мыши, которым вводили противопептидные антитела

## Лаборатория биокатализа (рук. Габибов А.Г.)

*Создан антидот против фосфорорганических отравляющих веществ пролонгированного действия на основе рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека.*



В результате проведенных исследований удалось разработать эффективную систему экспрессии активной бутирилхолинэстеразы человека в клетках линии CHO. Использование промотора EF-1 позволило значительно увеличить продукцию рекомбинантного белка клетками - с 3-5 мг/л до 40 мг/л. Были проведены опыты по оптимизации химической модификации рекомбинантного антидота. В результате удалось создать долгоживущий в токе крови полисиалированный фермент с кинетическими параметрами идентичными исходной бутирилхолинэстеразе способный протектировать мышей от 4,7 летальных доз отравляющего вещества VR. При этом в физиологических тестах животные не проявляли какие-либо изменения в поведении (Ilyushin et al. PNAS, 2013).

### **Лаборатория протеомики (рук. Говорун В.М.)**

В клетках модельного организма - мхе *Physcomitrella patens* - идентифицированы свыше 28 тыс эндогенных пептидов. На основе высокоточного масс-спектрометрического анализа впервые были продемонстрированы существенные различия между пептидомами протопластов, протонемы и гаметофоров, представленных несколькими тысячами уникальных пептидов. В протопластах мха в условиях стресса отмечены существенные изменения пептидома и транскриптома в сравнении с протонемой и гаметофорами.

Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia Tyakht, Alexander V.; Kostyukova, Elena S.; Popenko, Anna S.; et al. NATURE COMMUNICATIONS 2013 Volume: 4, Article Number: 2469

### **Лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов (рук. Гришин Е.В.)**

**Установлены полноразмерные структуры кДНК, кодирующие антифунгальные пептиды семян пшеницы Кихара (*Triticum kiharae*) и звездчатки средней (*Stellaria media*), принадлежащих к новому семейству защитных пептидов растений -  $\alpha$ -харпининов. Установлено участие N- и C-концевых участков пептида Sm-AMP-X семян звездчатки (*S. media*) в формирование вторичной структуры данного пептида, которая, в свою очередь, является одним из определяющих факторов, отвечающих за проявление его биологической активности.**

В результате 3'- и 5'RACE ПЦР были определены полноразмерные структуры кДНК  $\alpha$ -харпининов семян пшеницы Кихара (*Triticum kiharae*) и звездчатки средней (*Stellaria media*), соответствующие белкам-предшественникам, содержащим в своем составе тандемные повторы последовательностей, кодирующих гомологи зрелых пептидов. Исследование структурно-функциональной взаимосвязи нового антифунгального  $\alpha$ -харпинина из семян звездчатки средней (*S. media*) позволила доказать участие N- и C-концевых участков данной молекулы в формирование вторичной структуры, которая является одним из параметров, обеспечивающих реализацию функционального действия. Полученные научные результаты играют важную роль в исследовании молекулярных механизмов устойчивости культурных и дикорастущих растений к биотическим стрессовым факторам, а также могут быть использованы в прикладных исследованиях с целью повышения невосприимчивости сельскохозяйственных культур растений к грибным фитопатогенам.

- Utkina LL, Andreev YA, Rogozhin EA, Korostyleva TV, Slavokhotova AA, Oparin PB, Vassilevski AA, Grishin EV, Egorov TA, Odintsova TI. Genes encoding 4-Cys antimicrobial peptides in wheat *Triticum kiharae* Dorof. et Migush.: multimodular structural organization, intraspecific variability, distribution and role in defence. FEBS J. 2013, 280(15):3594-608.
- Slavokhotova AA, Rogozhin EA, Musolyamov AK, Andreev YA, Oparin PB, Berkut AA, Vassilevski AA, Egorov TA, Grishin EV, Odintsova TI. Novel antifungal  $\alpha$ -hairpinin peptide from *Stellaria media* seeds: structure, biosynthesis, gene structure and evolution. Plant Mol Biol. 2014,84:189-202.

## **Лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов (рук. Гришин Е.В.)**

***В яде пауков обнаружены «модульные» токсины, состоящие из двух пептидных доменов. Каждый из модулей у таких токсинов соответствует «обычному» нейротоксину или цитотоксину. Встречаются токсины с любой из четырех возможных комбинаций модулей в составе одной полипептидной цепи. Выработка модульных токсинов – общее явление для ядовитых паукообразных, соответствующее эволюционному вектору «от простого к сложному».***

Яды пауков – природные фармакопеи, состоящие из сотен биологически активных молекул, особое место среди которых занимают пептиды. Наиболее распространенными являются линейные катионные цитотоксины (ЦТ), а также цистеин-богатые нейротоксины (НТ). Две работы, опубликованные в этом году, завершают цикл, посвященный так называемым «модульным» токсинам пауков. Эти токсины построены из двух модулей или доменов, «сшитых» в одну полипептидную цепь. Каждый из модулей соответствует «обычному» однодоменному токсину – ЦТ или НТ. Примечательно, что в яде пауков встречаются все четыре возможных варианта: НТ-НТ, НТ-ЦТ, ЦТ-НТ и ЦТ-ЦТ. Предполагается, что модульные токсины возникли из белков-предшественников сложного типа, созревающих с образованием двух зрелых пептидов, в результате мутации мотивов процессинга. Такое усложнение – объединение двух структурных модулей в составе одной молекулы – привело к появлению у новых токсинов интересных функциональных особенностей. Например, двухмодульные токсины типа ЦТ-ЦТ приобрели высокую токсичность по отношению к насекомым, не характерную для изолированных доменов. Для токсинов типа НТ-ЦТ и ЦТ-НТ характерно мембрано-опосредованное связывание с мишенью (при этом ЦТ выступает как элемент, необходимый либо для первоначальной ассоциации с мембраной, либо для закоривания в мембране уже после образования комплекса с белковым рецептором), а домены токсинов типа НТ-НТ проявляют синергию.

- Kuzmenkov A.I., Fedorova I.M., Vassilevski A.A., Grishin E.V. (2013) Cysteine-rich toxins from *Lachesana tarabaevi* spider venom with amphiphilic C-terminal segments. Biochim. Biophys. Acta 1828, 724-731.
- Vassilevski A.A., Sachkova M.Y., Ignatova A.A., Kozlov S.A., Feofanov A.V., Grishin E.V. (2013) Spider toxins comprising disulfide-rich and linear amphipathic domains: A new class of molecules identified in the lynx spider *Oxyopes takobius*. FEBS J. 280, 6247-6261.

Предыдущие работы из цикла:

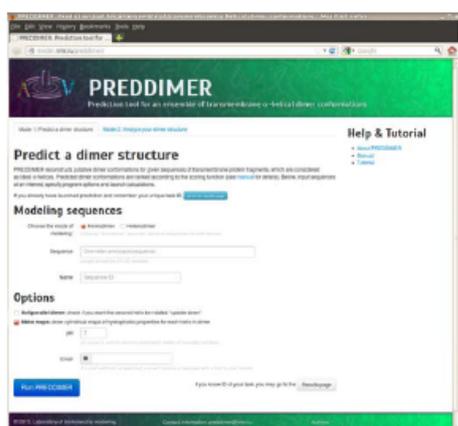
- Vassilevski A.A., Kozlov S.A., Samsonova O.V., Egorova N.S., Karpunin D.V., Pluzhnikov K.A., Feofanov A.V., Grishin E.V. (2008) Cyto-insectotoxins, a novel class of cytolytic and insecticidal peptides. Biochem. J. 411, 687-696.
- Vassilevski A.A., Fedorova I.M., Maleeva E.E., Korolkova Y.V., Efimova S.S., Samsonova O.V., Schagina L.V., Feofanov A.V., Magazanik L.G., Grishin E.V. (2010) Novel class of spider toxin: Active principle from the yellow sac spider *Cheiracanthium punctorium* venom is a unique two-domain polypeptide. J. Biol. Chem. 285, 32293-32302.

## Лаборатория моделирования биомолекулярных систем (Ефремов Р.Г.)

Создан **PREDDIMER** - веб-сервер для предсказания пространственной структуры димеров трансмембранных (ТМ) спиралей белков.

Разработанный авторами алгоритм предсказания димеров трансмембранных (ТМ) спиралей [1] реализован в виде веб-сервера PREDDIMER [2], доступного на сайте лаборатории: <http://model.nmr.ru/preddimer>. Сервер позволяет предсказывать набор конформаций гомо- и гетеродимеров на основании заданных последовательностей их ТМ спиралей, оценивать эффективность упаковки полученных димеров, а также визуально представлять результаты в виде трехмерных моделей структуры и двумерных карт распределения гидрофобных свойств на поверхности ТМ спиралей. Важной особенностью метода является его способность генерировать набор конформаций димеров, часть из которых может реализовываться в зависимости от функционального состояния белка и свойств мембранного окружения. Эффективность подхода продемонстрирована путем сравнения результатов предсказания с 11 известными ЯМР-моделями ТМ димеров.

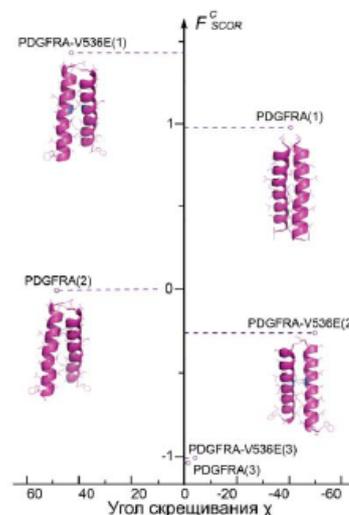
Сервер использован для предсказания структуры ТМ димеров рецептора фактора роста тромбоцитов А (PDGFRA) дикого типа и онкогенного ТМ мутанта (V536E). Показано, что мутация модулирует упаковку ТМ димеров данного рецептора. Этот эффект, в свою очередь, может быть связан с повышенной базальной активностью (в отсутствие лиганда) у PDGFRA V536E [3]. Работа проведена в сотрудничестве с экспериментальной группой в Католическом университете Лувена (Брюссель, Бельгия).



<http://model.nmr.ru/preddimer/>

Пептид	Ранг	$F_{SCOR}$	СКО, А	$\chi_c$
Vnlp3	2(7)	2.81	2.96	-59.8
Epha1	2(4)	3.11	2.35	20.1
Epha2	3(5)	2.52	2.07	20.1
ErbB1*	3(5)	2.80	2.78	-49.9
ErbB1/2	2(5)	3.30	2.20	-30.0
ErbB2	1(4)	3.36	1.43	-35.0
ErbB3	3(7)	2.72	3.94	15.4
ErbB4	3(4)	2.47	2.38	-25.4
FGFR3	2(5)	2.96	3.79	25.3
GpA	1(3)	3.93	1.56	-50.0
PDGFRb	3(5)	2.41	2.62	-0.4

Реалистичность предсказания ТМ димеров сервером. Сравнение с известными ЯМР-моделями.

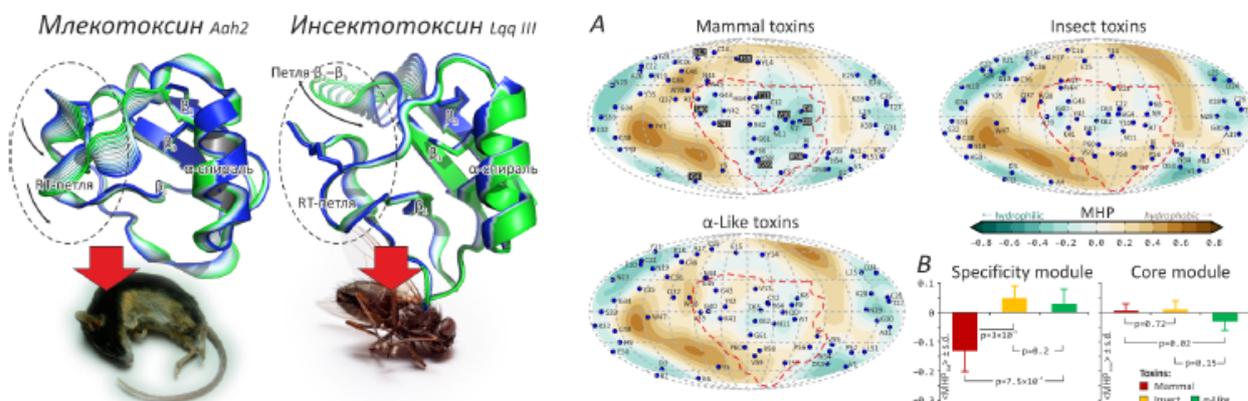


### Публикации:

1. Volynsky P.E., Polyansky A.A., Fakhrutdinova G.N., Bocharov E.V., Efremov R.G. Role of dimerization efficiency of transmembrane domains in activation of fibroblast growth factor receptor 3. (2013) *J. Amer. Chem. Soc.* 135, 8105-8108.
2. Polyansky AA, Chugunov AO, Volynsky PE, Krylov NA, Nolde DE, Efremov RG. PREDDIMER: a web server for prediction of transmembrane helical dimers. (2013) *Bioinformatics* doi: 10.1093/bioinformatics/btt645
3. Velghe AI, Van Cauwenberghe S, Polyansky AA, Chand D, Montano-Almendras CP, Charni S, Hallberg B, Essaghir A, Demoulin JB. (2013) *Oncogene* doi: 10.1038/onc.2013.218.

## Лаборатория моделирования биомолекулярных систем (Ефремов Р.Г.)

### Модульная организация и основа селективного действия $\alpha$ -нейротоксинов из яда скорпионов (совместно с Лабораторией нейрорецепторов и нейрорегуляторов)



В Лаборатории моделирования биомолекулярных систем разработан оригинальный и эффективный в вычислительном отношении метод расчета и визуализации распределения физико-химических свойств белков на их поверхности - метод «Белковой топографии». Метод дает возможность проведения сравнительного количественного анализа свойств поверхностей для группы белков. С его помощью установлены молекулярные детерминанты селективного действия на потенциал-чувствительные натриевые каналы (ПЧНК)  $\alpha$ -нейротоксинов из яда скорпионов, предложена модель модульной организации токсинов, согласно которой эти белки содержат *модуль специфичности* и *«сердцевинный» модуль*. Выдвинута гипотеза о том, что такое модульное строение отражает доменную структуру ПЧНК.

Найденная закономерность в строении  $\alpha$ -нейротоксинов позволяет делать предсказания относительно активности неизвестных молекул из этой же группы, а также проводить рациональный дизайн пептидов с требуемой селективностью. Так, было предсказано, что  $\alpha$ -нейротоксин ВеМ9 из яда скорпиона *M. Eupreus* должен обладать смешанной млеко/инсектотоксичностью, что и было подтверждено в биохимическом эксперименте на рекомбинантном токсине, полученном в Лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов.

#### Публикация:

Chugunov A.O., Koromyslova A.D., Berkut A.A., Peigneur S., Tytgat J., Polyansky A.A., Pentkovsky V.M., Vassilevski A.A., Grishin E.V., Efremov R.G. (2013). Modular Organization of  $\alpha$ -Toxins from Scorpion Venom Mirrors Domain Structure of Their Targets — Sodium Channels. *J. Biol. Chem.* 288, 19014–19027

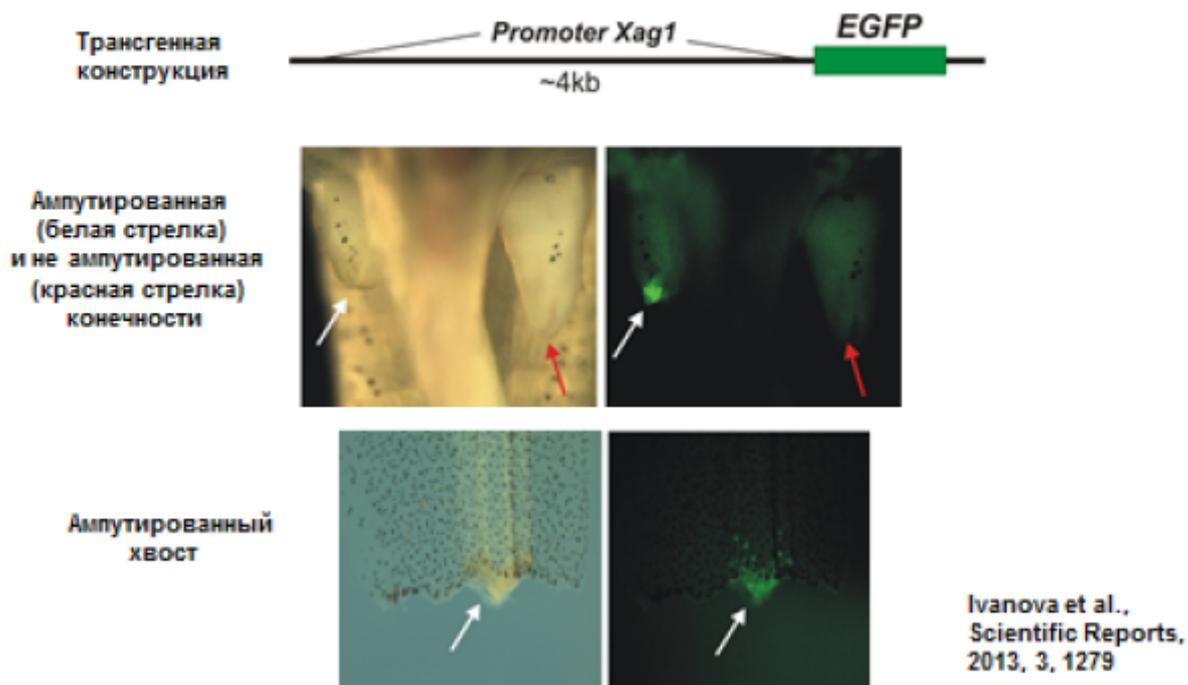
## Лаборатория молекулярных основ эмбриогенеза (рук. Зарайский А.Г.)

**Впервые установлено, что секретируемые белки семейства Ag1 присутствуют только у низших позвоночных (рыбы, амфибии), но отсутствуют у высших (рептилии, птицы, млекопитающие).**

Впервые установлено, что секретируемые белки семейства Ag1 присутствуют только у низших позвоночных (рыбы, амфибии), но отсутствуют у высших (рептилии, птицы,

млекопитающие). При этом, на модели головастиков шпорцевой лягушки нами было показано, что гены Ag1 активируются в клетках регенерационной бластемы при регенерации хвоста и задней конечности. Учитывая эти данные, а также литературные данные других авторов об участии гомологов Ag1 – белков Agr2 – в регуляции регенерации конечностей у тритона, мы выдвинули гипотезу о том, что утрата высшими позвоночными способности к регенерации больших придатков тела могла быть связана с потерей их предками генов семейства Ag1.

**Активация экспрессии EGFP под контролем промотора гена *Xag1* в клетках регенерационной бластемы ампутированной конечности и хвоста головастика шпорцевой лягушки**



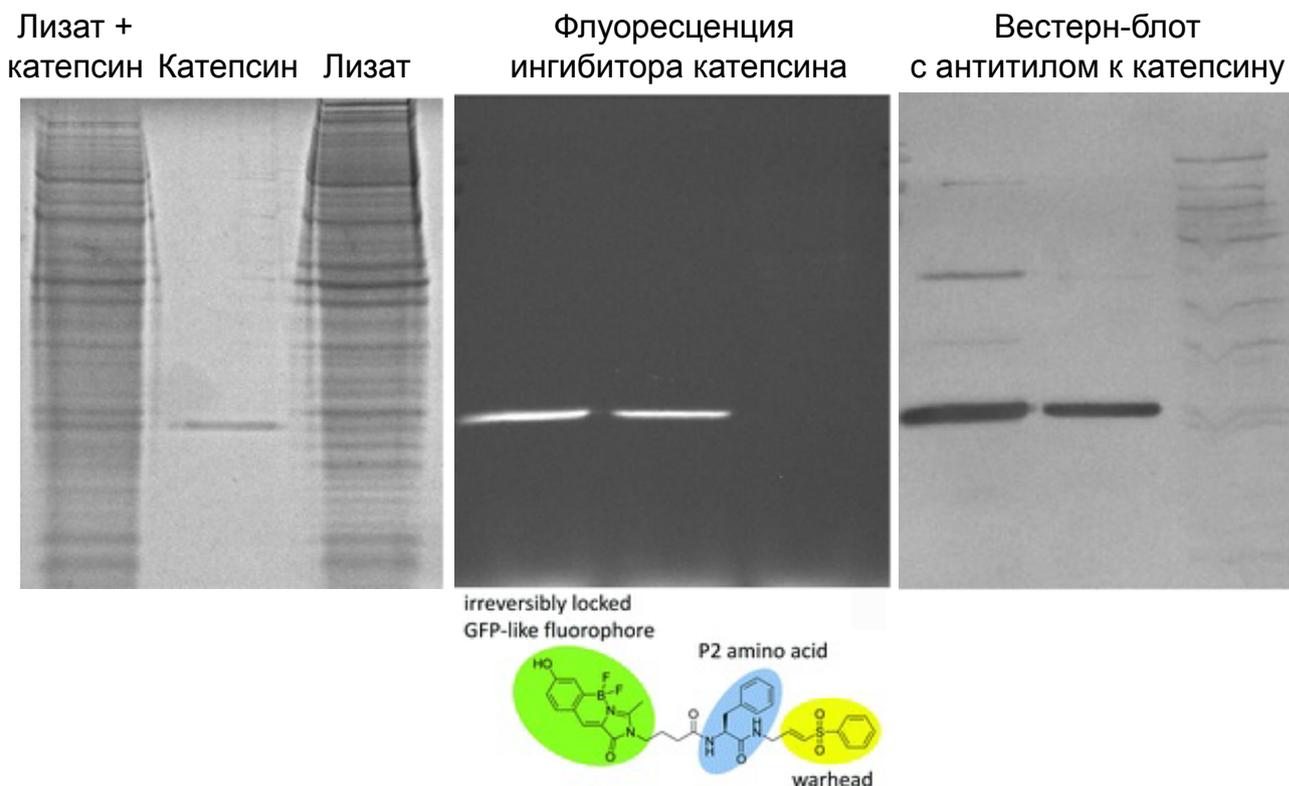
Ivanova A.S., Tereshina M.V., Ermakova G.V., Belousov V.V. Zaraisky A.G. Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles. *Scientific Reports*, 2013, 3, 1279.

**Лаборатория сравнительной и функциональной геномики  
(рук. Лебедев Ю.Б.)**

*Впервые выполнен глубокий сравнительный анализ индивидуальных репертуаров T-клеточных рецепторов (ТКР) для группы монозиготных близнецов и определен вклад генетических факторов в формирование адаптивного иммунитета человека.*

С использованием оригинальной стратегии получения, широкомасштабного секвенирования и специализированного биоинформатического анализа репрезентативных библиотек кДНК  $\alpha$ - и  $\beta$ -ТКР реконструированы индивидуальные репертуары периферических Т-лимфоцитов для четырех пар монозиготных близнецов и проведен исчерпывающий сравнительный анализ полученных репертуаров. Установлено, что а) Т-клеточные репертуары близнецовых пар не отличаются от пар неродственных индивидов по числу совпадений в клональном разнообразии общего пула Т-лимфоцитов б) функционально активная часть репертуаров у монозиготных близнецов значительно обогащена идентичными по структуре антиген-распознающих участков  $\alpha$ - и  $\beta$ -ТКР (CDR3-





Мечение катепсина зондом, содержащим необратимый ингибитор катепсина и флуоресцентную группу, подобную хромофору GFP. Флуоресценция нового зонда (средняя панель, структура зонда показана внизу) позволяет детектировать катепсин на белковом геле-электрофорезе, в том числе, в присутствии избытка других белков (лизат клеток НЕК293) со специфичностью, превосходящей таковую стандартного метода окраски с антителами против катепсина (правая панель).

Frizler M., Yampolsky I.V., Baranov M.S., Stirnberg M and Gütschow M. Chemical introduction of the green fluorescence: imaging of cysteine cathepsins by an irreversibly locked GFP fluorophore. *Org. Biomol. Chem.*, 2013, 11, 5913.

Baranov M.S., Solntsev K.M., Lukyanov K.A. and Yampolsky I.V. Synthetic approach to GFP chromophore analogs from 3-azidocinnamates. Role of methyl rotors on the chromophore photophysics. *Chem. Commun.*, 2013, 49 (51), 5778-5780.

Баранов М.С., Лукьянов К.А., Ямпольский И.В. Синтез хромофоров флуоресцентных белков и их аналогов. *Биоорганическая химия*, 2013, 39, 255–276.

Baranov M.S., Lukyanov K.A., Ivashkin P.E., Yampolsky I.V. An efficient synthetic approach to fluorescent oxazole-4-carboxylate derivatives. *Synth. Commun.*, 2013, 43, 2337-2342.

Baranov M.S., Yampolsky I.V. Novel condensations of nitroacetic esters with aromatic aldehydes leading to 5-hydroxy-1,2-oxazin-6-ones. *Tetrahedron Lett.*, 2013, 54, 628-629.

### **Лаборатория биотехнологии (рук. Мирошников А.И.)**

Разработаны способы получения 2,6-пурин-дизамещенных модифицированных нуклеозидов, содержащих в С6-положении остатки хиральных аминокислот (серина, лизина и т.п.) и неприродные остатки 3'-дезоксирибозы, арабинозы и 2'-фторарабинозы. Получены первые результаты тестирования противоопухолевой активности синтезированных соединений на клеточной линии Т-лимфобластного лейкоза U937.

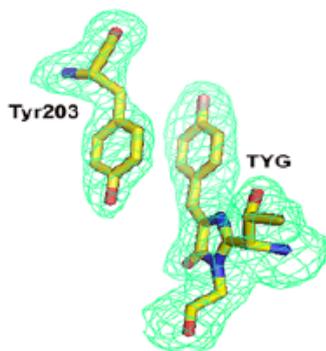
Впервые с помощью пурипнуклеозидфосфорилазы *E. coli* получена серия из пятнадцати новых нуклеозидов на основе 4,5,6-тризамещенных бензимидазолов рибо-, 2'-дезоксирибо-, 3'-дезоксирибо- и 2'-фторарабино- рядов для тестирования противоопухолевой и противовирусной активности.

## Лаборатория рентгеноструктурного анализа (рук. Плетнев В.З.)

**Методами рентгеноструктурного анализа высокого разрешения и сайт-направленного мутагенеза установлены пространственные структуры и изучена структурно-функциональная взаимосвязь серии новых флуоресцентных белков (ФБ) зеленого, желтого и красного спектральных диапазонов.**

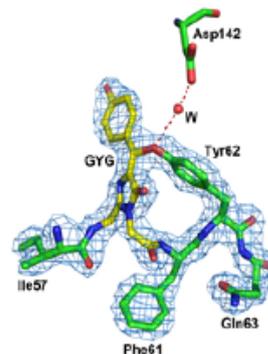
Методом рентгеноструктурного анализа установлены пространственные структуры зеленого IaGFP ( $\lambda_{\text{возб.}}=502$  нм и  $\lambda_{\text{эм.}}=511$  нм), а также красного флуоресцентного белка (ФБ) дикого типа - IaRFP ( $\lambda_{\text{возб.}} = 521$  нм и  $\lambda_{\text{эм.}} = 592$  нм; *Branchiostoma Lanceolatum*) и его спектрально и структурно идентичного генно-инженерного варианта с улучшенным фолдингом - IaRFP-del\_S83 (с делецией остатка Ser83) при разрешении 1.7, 2.3 и 1.9 А, соответственно.

Хромофор (Tyr-Tyr-Gly) желтого флуоресцентного белка phiYFP в электронной плотности



Сдвиг флуоресцентной эмиссии белка из зеленой в желтую ( $\Delta\lambda \sim 537$  нм) область спектра вызван  $\pi$ -столкновением взаимодействием ароматических колец Tyr хромофора и соседнего Tyr203

Хромофор (показан желтым) красного флуоресцентного белка IaRFP (*Branchiostoma Lanceolatum*) в электронной плотности.



Сдвиг флуоресценции из зеленой в красную область спектра ( $\Delta\lambda \sim 594$  нм) вызван образованием необычной ковалентной связи между хромофором и ближайшим остатком Tyr62

Это первые ФБ с установленной пространственной структурой из группы хордовых структурно неизученного подсемейства *Bilaterian*. Основные особенности пространственной организации зеленого IaGFP близки таковым других известных зеленых ФБ. Напротив, структура IaRFP впервые продемонстрировала необычные структурные черты, отсутствующие у других ФБ дикого типа из *Cnidarian*. Первое, у красного IaRFP обнаружена необычная хромофор образующая последовательность Gly58-Tyr59-Gly60. Второе, у него обнаружен остаток Gln211 (предположительно ключевой для формирования хромофора) вместо консервативного каталитического Glu211, характерного для всех известных до сих пор природных ФБ. Третье, структура хромофора характеризуется отсутствием типичной для красных белков N-ацилиминной двойной связи, а также наличием необычной ковалентной связи между атомом (Tyr59) $C^{\beta}$  хромофора и гидроксильной группы ближайшего остатка Tyr62. Предполагается, что именно эта ковалентная связь в первую очередь является ответственной за наблюдаемый большой сдвиг Стокса (LSS)  $\sim 80$  нм (Рис. 2). Методом сайт-направленного мутагенеза установлены ключевые аминокислотные остатки в области хромофора красного IaRFP ответственные за его необычные спектральные характеристики и предложен

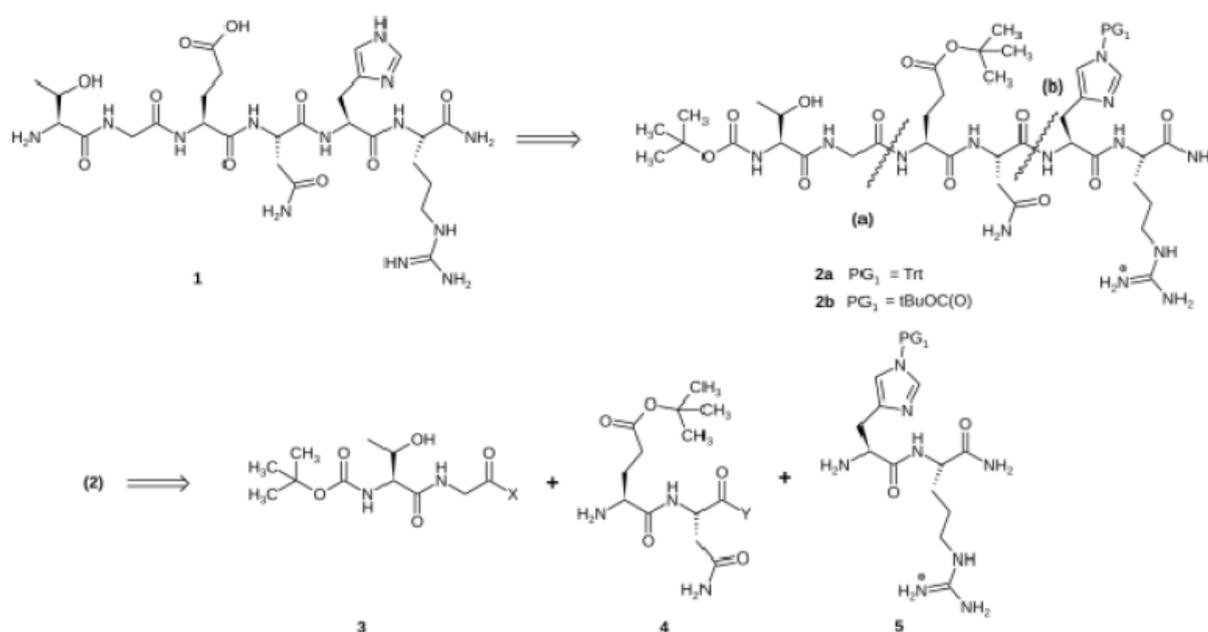
молекулярный механизм образования ковалентной связи между хромофором и Tyr62 в процессе пост-трансляционной модификации белка.

Pletneva NV, **Pletnev VZ**, Souslova E, Chudakov DM, Lukyanov S, Martynov VI, Arkhipova S, Artemyev I, Wlodawer A, Dauter Z. and Pletnev S. "Yellow fluorescent protein phiYFPv (*phialidium*). Crystal structure and structure based mutagenesis." (2013) *Acta Cryst.* **69D**, 1005-1012

**Pletnev VZ**, Pletneva NV, Souslova EA, Lukyanov KA, Chudakov DM, Fradkov AF, Chepurnykh T, Wlodawer A, Dauter Z and Pletnev S "Crystal Structure of red emitting laRFP (*Branchiostoma Lanceolatum*): Catalytic Gln211, GYG Chromophore Covalently Bound with proximal Tyr62" (2013) *Acta Cryst.* **69D** 1850-1860.

### Группа химии пептидов (рук. Родионов И.Л.)

Разработан метод синтеза амидной формы пептида HLDF-6. Ретросинтетический анализ разработанного метода синтеза представлен на схеме:



Ретросинтетический анализ целевого продукта, амидной формы пептида HLDF-6. Основные пути расщеления молекулы показаны волнистыми линиями и обозначены (a) и (b).

V. N. Azev, L. G. Mustaeva, E. Y. Gorbunova et al. Formation of Truncated Peptide by-Products via Sequence-specific Formyl Group Transfer from Trp(For) Residues to N□ in the Course of Boc-SPPS. *Journal of Peptide Science*. 2013. Vol. 19, no. 10. P. 607-612.

### Лаборатория клеточных взаимодействий (рук. Сапожников А.М.)

**Продемонстрировано выраженное иммуностимулирующее действие миелопептидов МП-1, МП-3 и МП-5, совместно размещенных на полимерной молекуле-носителе. Указанная конструкция существенно увеличивала продукцию интерферона-гамма клетками иммунной системы и уровень экспрессии рецепторов, активирующих эффекторы врожденного иммунитета.**

В экспериментах с лейкоцитами, выделенными из периферической крови человека, было установлено, что полученный нами совместно с лабораторией химии пептидов конъюгат миелопептидов МП-1, МП-3 и МП-5 с молекулой полилизина обладает иммуностимулирующим действием, достоверно превышающем таковой, зарегистрированный у компонентов конъюгата и их смеси. Об иммуностимулирующем эффекте созданной конструкции свидетельствовала выраженная индукция этим препаратом синтеза и секреции интерферона-гамма в культуре мононуклеаров периферической крови человека, а также значительное усиление уровня экспрессии моноцитами и нейтрофилами рецепторов TLR-2 и TLR-4.

**Конъюгат поли-L-лизина с миелопептидами  
МП-1, МП-3 и МП-5**

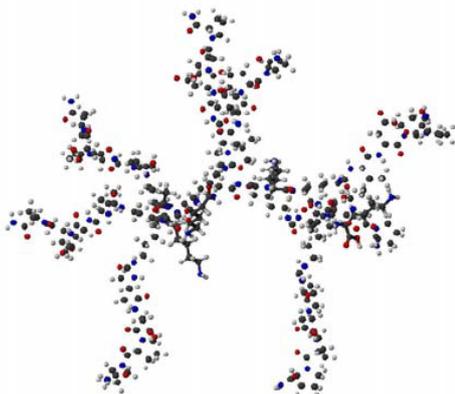
МП-1 FLGFPT-ε-аминокапроновая кислота  
 МП-3 LVC(Asn)YRQ-ε-аминокапроновая кислота  
 МП-5 VVYPD-ε-аминокапроновая кислота  
 поли-L-лизин 15.000-30.000 Да

**Соотношение по массе (мг):**

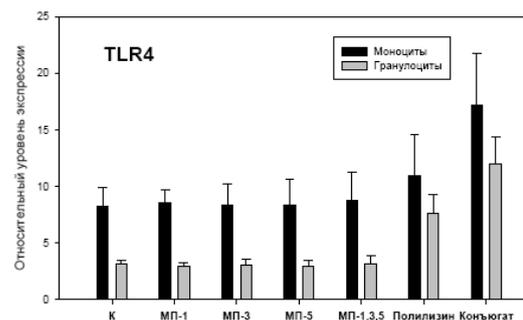
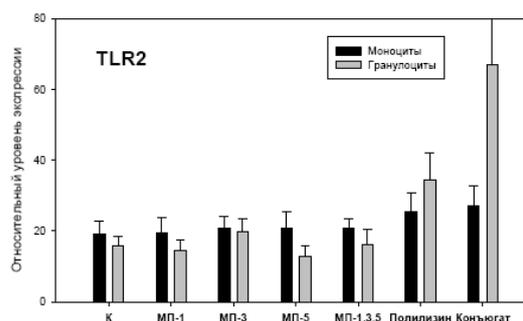
поли-L-лизин : МП-1 : МП-3 : МП-5  
 9 0,7 0,7 0,7

**Соотношение по количеству вещества (мкМоль):**

поли-L-лизин : МП-1 : МП-3 : МП-5  
 0,5 1 1 1



**Иммуномодулирующие эффекты: влияние на  
экспрессию TLR-рецепторов лейкоцитов человека**



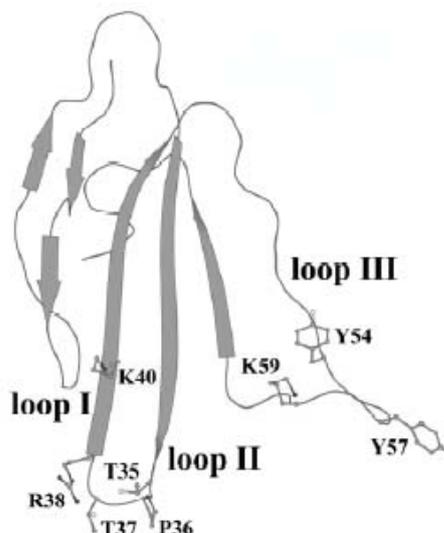
**Отдел молекулярных основ нейросигнализации  
(рук. Цетлин В.И.)**

**Совместно с Отделом биоинженерии**

*Получена серия мутантов водорастворимой формы белка Lynx1 из мозга человека (ws-Lynx1), сходного по пространственной структуре с трехпетельными α-нейротоксинами змей и взаимодействующего с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR).*

Совместно с Отделом биоинженерии получена серия мутантов водорастворимой формы белка Lynx1 из мозга человека (ws-Lynx1), сходного по пространственной структуре с трехпетельными α-нейротоксинами змей и взаимодействующего с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR). Методами радиолигандного анализа и электрофизиологии идентифицированы аминокислотные остатки ws-Lynx1, существенные для связывания с мышечными и/или нейрональными nAChR. На основании впервые определенных констант взаимодействия ws-Lynx1 с его рецепторными мишенями установлено, что модулирующие эффекты Lynx1 на nAChR могут объясняться невысоким (микромольным) средством и быстрой диссоциацией, в отличие от α-

нейротоксинов, имеющих наномольное сродство и приводящих к необратимому ингибированию nAХР.



Пространственная структура ws-Lynx1 с указанием положений проведенных мутаций.

Lyukmanova EN, Shulepko MA, Buldakova SL, Kasheverov IE, Shenkarev ZO, Reshetnikov RV, Filkin SY, Kudryavtsev DS, Ojomoko LO, Kryukova EV, Dolgikh DA, Kirpichnikov MP, Bregestovski PD, Tsetlin VI. Water-soluble LYNX1 residues important for interaction with muscle-type and/or neuronal nicotinic receptors. *J Biol Chem.* 288, 15888-15899 (2013)

### **Лаборатория геномики адаптивного иммунитета (рук. Чудаков Д.М.)**

*Разработано открытое программное обеспечение для анализа данных массивного секвенирования Т-клеточных рецепторов, MiTCR:*

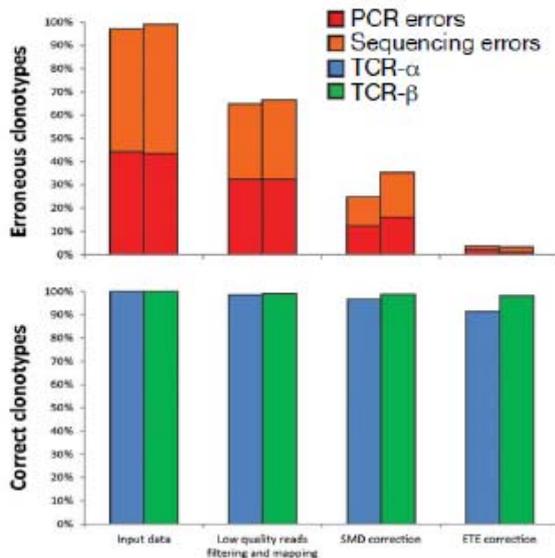
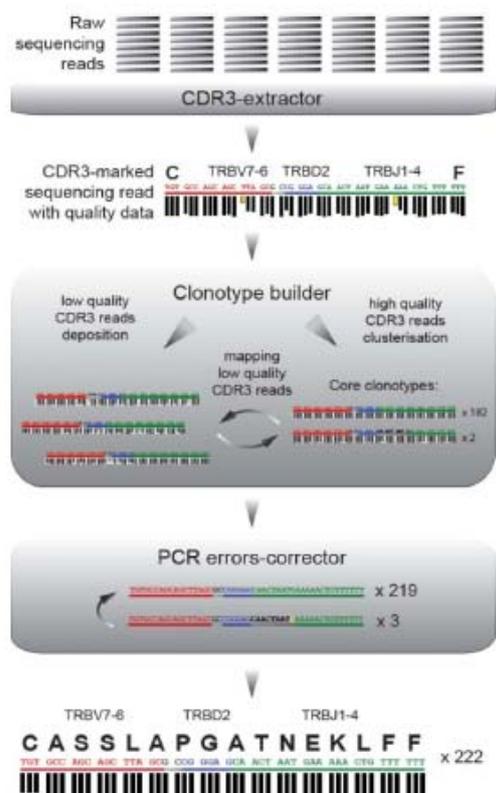
<http://mitcr.milaboratory.com/>

Программный пакет MiTCR, опубликованный в журнале **NatureMethods** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23892897>), не имеет мировых аналогов ни по скорости, ни по качеству, ни по объему обработки предварительных данных массивного секвенирования репертуаров Т-клеточных рецепторов.

В MiTCR реализованы новые быстрые и универсальные алгоритмы для анализа данных секвенирования Т-клеточных рецепторов и коррекции содержащихся в них ошибок. Программа сделана так, чтобы ее мог использовать любой биолог в своих исследованиях. Она позволяет получать биологически значимые данные, корректно и эффективно удаляя имеющиеся в исходных предварительных данных ошибки ПЦР и секвенирования.

Код MiTCR тщательно оптимизировался для ускорения его работы. Стадии обработки и коррекции ошибок объединены в один «конвейер». Это позволяет минимизировать необходимое для обработки количество оперативной памяти и дискового пространства. Также это делает возможным потоковую однопроходную обработку данных (например, при чтении из удаленного хранилища). В модулях коррекции ошибок реализованы алгоритмы с использованием префиксных деревьев для быстрого решения задач нечеткого поиска и кластеризации нуклеотидных последовательностей. Все вычислительно затратные этапы анализа распараллелены для использования всех имеющихся в системе процессорных ядер. В результате, например, анализ типичного объема данных, получаемого с одной дорожки секвенатора HiSeq 2000 (около 130 млн. коротких

последовательностей, ~ 13 млрд. нуклеотидных оснований общим объемом около 35 Гб) занимает около 20 минут на обычном компьютере (AMD Phenom II X4 955 @ 3.2 GHz; необходимый объем ОЗУ зависит от сложности образца, т.е. содержащегося в нем разнообразия Т-клеточных рецепторов, типичное значение 4 - 12Гб ).



Bolotin DA et al. MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis. *Nature Methods*, 2013

MiTCR является программой с открытым исходным кодом (лицензия GPLv3), написан на Java 7 и имеет хорошо документированный API для использования из Java и Groovy приложений. Разработка велась (и продолжается) с использованием современных подходов к программированию: модульного тестирования (JUnit), распределенной системы управления версиями (Mercurial), автоматизированной системы сборки (Maven) и системы непрерывной интеграции (Teamcity). Хранилище исходного кода открыто и доступно на <http://bitbucket.org>. Бинарные пакеты опубликованы в центральной репозитории Maven (MavenCentralRepository).

### Лаборатория геномики адаптивного иммунитета (рук. Чудаков Д.М.)

*Разработана технология массированного спаривания и идентификации нативных пар альфа- и бета- цепей Т-клеточных рецепторов с помощью эмульсионного ОТ-ПЦР, реакции перекрытия-удлинения и секвенирования нового поколения.*

Была продемонстрирована техническая возможность массированной идентификации нативных пар Т-клеточных рецепторов с использованием эмульсионной ОТ-ПЦР с живых клеток и секвенирования нового поколения.

Результаты опубликованы в работе: Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. Turchaninova MA, Britanova OV, Bolotin DA, Shugay M, Putintseva EV, Staroverov DB, Sharonov G, Shcherbo D, Zvyagin IV, Mamedov IZ, Linnemann C, Schumacher TN, Chudakov DM. **Eur J Immunol.** 2013 May 22. doi: 10.1002/eji.201343453.

Однако, разработанный нами метод принципиально ограничен узким сегментом вариантов альфа- и бета-цепей Т-клеточных рецепторов, и не может быть напрямую экстраполирован на все разнообразие Т-клеточных рецепторов. Ведется работа по совершенствованию технологии.

## Группа лесной биотехнологии (рук. Шестибратов К.А.)

### *Трансгенное растение осины с повышенной продуктивностью и модифицированной древесиной*

Завершены испытания трансгенных форм осины *Populustremulac* суперэкспрессией гена глутаминсинтетазы GS1 из сосны.

Параметр	Контроль PtV22	PtV22XGS(8)2	PtV22IXGS(6)8
Реакция на PPT	2	1,2	1,1
Содержание целлюлозы, %	29,6	33,3 (ув. на 11,2%)	33,6 (ув. на 11,3%)
Содержание лигнинов, %	33,6	30,8 (сн. на 8,4%)	30,8 (сн. на 8,4%)
Содержание азота во флоэме, %	0,88	0,94 (ув. на 6,8 %)	0,97 (ув. на 10,2%)
Высота, см (3-летние растения)	136,3	153,2	167,8
Объем стволовой части, см <sup>3</sup>	37,8	45,9	53,1
Ширина либриформа, мкм	17,3	32,6	42,9
Толщина стенки либриформа, мкм	2,9	7,3	6,3

По результатам испытаний в условиях лаборатории, теплицы и открытой площадки отобраны и охарактеризованы два лучших клона **PtV22XGS(8)2** и **PtV22IXGS(6)8**. Созданные формы отличаются от исходного генотипа повышенной продуктивностью, сниженным содержанием лигнинов, повышенным содержанием целлюлозы. Древесинные волокна (либриформ) данных клонов отличаются по биометрическим параметрам – увеличена толщина стенки и ширина либриформа. Длина волокон осталась неизменной.

Лебедев В.Г., Шестибратов К.А. Трансгенное растение осины с повышенной продуктивностью и модифицированной древесиной. Заявка на изобретение № 2013149030. Приоритет от 05.11.2013.

## Лаборатория механизмов генной экспрессии ИБХ РАН

(рук. Шпаковский Г.В.)

*Впервые найдены белковые партнёры специфичных для человека изоформ hRPB11bβ и hRPB11cβ субъединицы РНК-полимеразы II POLR2J (hRPB11) в нервной и лимфоидной тканях Homo sapiens. Среди белков-партнёров сходных между собой изоформ hRPB11bβ и hRPB11cβ (116 а.о.) обнаружены субъединица РНК-полимеразы II hRPB6 и ряд белков, участвующих в биогенезе и регуляции функционирования siRNAs (Y14 [RBM8A], DCAF, EIF6, RPS3A), в том числе новый, ранее не описанный вариант ядерной рибонуклеазы III DROSHA, что указывает на существование у Homo sapiens нового, особого типа сопряжения процессов транскрипции и РНК-интерференции.*

С помощью генетического (дрожжевая двухгибридная система) и биохимического (соосаждение белков из клеточных лизатов) подходов осуществлён полномасштабный поиск белков-партнёров описанных нами ранее вариантов субъединицы РНК-полимеразы II человека hRPB11 – hRPB11bβ, hRPB11cβ – в протеоме человека (эмбриональный мозг и клеточная линия Jurkat). В результате определён основной спектр белковых партнёров этих специфичных для человека изоформ субъединицы РНК-полимеразы II hRPB11 (POLR2J).

Белок	Функция	Число клонов	Установленная минимальная область (зона) взаимодействия
<b>Изоформа RNASEN (DROSHA)</b>	<b>Биогенез микроРНК</b> (начальная стадия, в ядре клетки)	<b>3</b> клона (1 вариант) <b>Новый белок – DROSHA (+14 а.о.)</b>	Аминокислотные остатки (а.о.) 1157–1351 из 1351
<b>hRPB6 (POLR2F)</b>	<b>Транскрипция</b> (одна из 5 общих субъединиц РНК-полимераз I-III; возможно участие и в синтезе микроРНК)	2 клона (1 вариант)	а.о. 81–127 из 127
<b>EIF6</b>	Трансляция (фактор инициации трансляции; участвует также в регуляции микроРНК)	2 клона (1 вариант)	всё 245 а.о. (полный белок)
<b>RBM8A (Y14)</b>	<b>Сплайсинг</b> (белок комплекса EJC; возможно участие и в регуляции синтеза «интронных» микроРНК)	1 клон (1 вариант)	а.о. 1–126 из 174
<b>DCAF</b>	<b>Роль в генерировании siRNAs и модификации хроматина</b> (фактор, ассоциированный с белками DBP1 и CUL4)	1 клон (1 вариант)	а.о. 100–342 из 342
<b>RPS3A</b>	Трансляция (один из белков малой субчастицы рибосомы, участвует и в регуляции микроРНК)	4 клона (1 вариант)	всё 264 а.о. (полный белок)

Среди белков-партнёров сходных между собой изоформ hRPB11bβ и hRPB11cβ (116 а.о.) обнаружены субъединица РНК-полимеразы II hRPB6, новый, ранее не описанный вариант ядерной рибонуклеазы III DROSHA (RNASEN), коровый компонент белкового комплекса экзонных сочленений EJC (exon-exon junction complex) Y14 (RBM8A), а также белки DCAF, EIF6 и RPS3A. Наличие в этом списке особого варианта иницирующей нуклеазы процессинга микроРНК (miRNAs) DROSHA и участвующих в биогенезе и регуляции функционирования siRNAs белков EIF6, RPS3A и DCAF указывает на новый тип сопряжения процессов транскрипции и РНК-интерференции у *Homo sapiens*.

Шематорова Е.К., Шпаковский Д.Г., Шпаковский Г.В. «Новые комплексы генной экспрессии и их роль в возникновении и эволюции рода *Homo*»; *Цитология*, 2013, т. 55, № 3, с. 172-177; *Cell and Tissue Biology*, 2013, v. 7, No. 4, pp. 314–319.

## **II. Научная и научно-организационная деятельность в 2013г.**

### **Ученый совет**

**В 2013 году состоялось 10 заседаний Ученого совета и 2 Конференции научных сотрудников ИБХ.**

На Конференциях научных сотрудников Института проведены выборы директора и нового состава Ученого совета ИБХ.

#### ***Основные вопросы, рассмотренные на заседаниях Ученого совета:***

Выборы заместителей директора и Ученого секретаря Института.

Утверждение плана научно-исследовательских работ на 2014 г.; отчета о выполнении научно-исследовательских работ, научно-организационной деятельности и перечня важнейших достижений лабораторий за 2013 г.

Изменения и дополнения в Устав Института.

Выдвижение кандидатур на соискание Премии Правительства Москвы молодым ученым в 2013 г.

Изменения в структуре института, в том числе организация отдела пептидно-белковых технологий, лаборатории иммунохимии ФИБХ, лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон), ликвидация лаборатории молекулярных технологий.

О кадровой политике в ИБХ РАН. Проведение конкурсов на замещение вакантных должностей руководителей подразделений, старших научных сотрудников, научных сотрудников и младших научных сотрудников Института.

Результаты комплексной проверки Института за 2008-2013 гг.

Выдвижение кандидатур на соискание грантов Президента РФ для государственной поддержки научных школ и молодых российских ученых – докторов и кандидатов наук.

Отчеты по грантам Президента РФ и проектам, выполняемым по Госконтрактам.

Поддержка проектов, выполняемых по Госконтрактам.

Утверждение и изменение тем диссертаций.

Утверждение учебных планов и рабочих программ подготовки аспирантов ИБХ РАН.

Обсуждение Закона о реорганизации РАН.

Поддержка ходатайств о присвоении почетных званий и званий профессора.

Организация работы вспомогательных подразделений.

- Обсуждение финансовых вопросов деятельности ИБХ.
- Создание Центра биомолекулярных технологий на базе ИБХ.
- Обсуждение работы сайта ИБХ.
- Продление полномочий профкома ИБХ.

## **Подготовка научных кадров по физико-химической биологии и биотехнологии**

### **Подготовка научных кадров по физико-химической биологии и биотехнологии**

#### ***Научно-образовательный центр (НОЦ) ИБХ РАН***

В 2013 г. Учебно-научный центр (УНЦ) ИБХ РАН участвовал в выполнении заданий Программы целевых расходов Президиума РАН «Поддержка молодых ученых» в рамках проекта «Поддержка деятельности Научно-образовательного центра ИБХ РАН». В соответствии с учебными программами в 2013 году были проведены теоретические и практические занятия со студентами и аспирантами 11 специализированных кафедр 9 факультетов 7 ведущих вузов, среди которых:

- кафедра биоорганической химии (40 студентов) и кафедра биофизики (4 студента) биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова;
- кафедра фармации (9 студентов) факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В.Ломоносова;
- кафедра физико-химической биологии и биотехнологии (30 студентов) факультета биологической и медицинской физики Московского физико-технического института;
- кафедра биотехнологии (6 студентов) и кафедра химии и технологии биологически активных соединений (9 студентов) факультета биотехнологии и органического синтеза Московского государственного университета тонких химических технологий им. М.В.Ломоносова;
- кафедра химии и технологии биомедицинских препаратов (2 студента) факультета химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева;
- кафедра биотехнологии (4 студента, 8 аспирантов) факультета биотехнологии и промышленной экологии Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева;
- кафедра биоорганической химии и биотехнологии (10 студентов) биолого-химического факультета Московского педагогического государственного университета;

- кафедра биотехнологии (97 студентов) фармацевтического факультета Первого московского государственного медицинского университета им. И.М.Сеченова;

- кафедра генетики, микробиологии и биотехнологии (1 студент) биологического факультета Кубанского государственного университета.

В течение 2013 года в НОЦ ИБХ РАН прошли обучение 220 студентов, из них 95 выполнили курсовые и дипломные работы.

С 11 по 15 февраля 2013 г. Учебно-научный центром ИБХ РАН при поддержке РФФИ и Программы целевых расходов Президиума РАН «Поддержка молодых ученых» была проведена юбилейная XXV международная зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", посвященная 30-летию Учебно-научного центра ИБХ РАН. На заседаниях Школы присутствовало более 300 слушателей из различных вузов, в том числе из МГУ им. М.В. Ломоносова, МФТИ, МИТХТ им. М.В. Ломоносова, МГПУ и др., молодыми учеными – лучшими выпускниками Учебно-научного центра - было представлено 42 устных доклада и 75 стендовых сообщений. В рамках Школы был проведен конкурс на лучшую научно-исследовательскую работу, в котором приняли участие 78 молодых ученых.

## **Аспирантура ИБХ**

### **Подготовка научных кадров высшей квалификации**

В аспирантуре Института в отчетном 2013 году обучалось 84 аспиранта. До окончания срока отчислены по собственному желанию 8 человек. 1 человек находится в декретном отпуске. Окончили аспирантуру в 2013 году 15 человек, из них 3 успешно: досрочно защищены 3 диссертационные работы. Сдали успешно вступительные экзамены и зачислены в аспирантуру на бюджетные места 21 человек. 4 человека переведены в аспирантуру ИБХ из других Институтов.

### **Специализированный совет по защитам диссертаций**

В 2013 г проведено 21 заседание Диссертационного совета: защищено 19 диссертаций, из них - 2 докторских и 17 кандидатских диссертаций.

## Научные публикации ИБХ за 2013 год

	опубликовано в 2013 году				
	монографий	сборников	статей	тезисов	др.
на русском языке	3	2	130	128	
на иностранном яз.	2	9	194	208	
всего	5	12	324	336	

Среди опубликованных в 2013 году статей – 18 с импакт фактором выше 9 (IF>9).

Суммарный IF по 18 статьям: 282

Наиболее высокорейтинговые издания, в которых опубликованы работы Института:

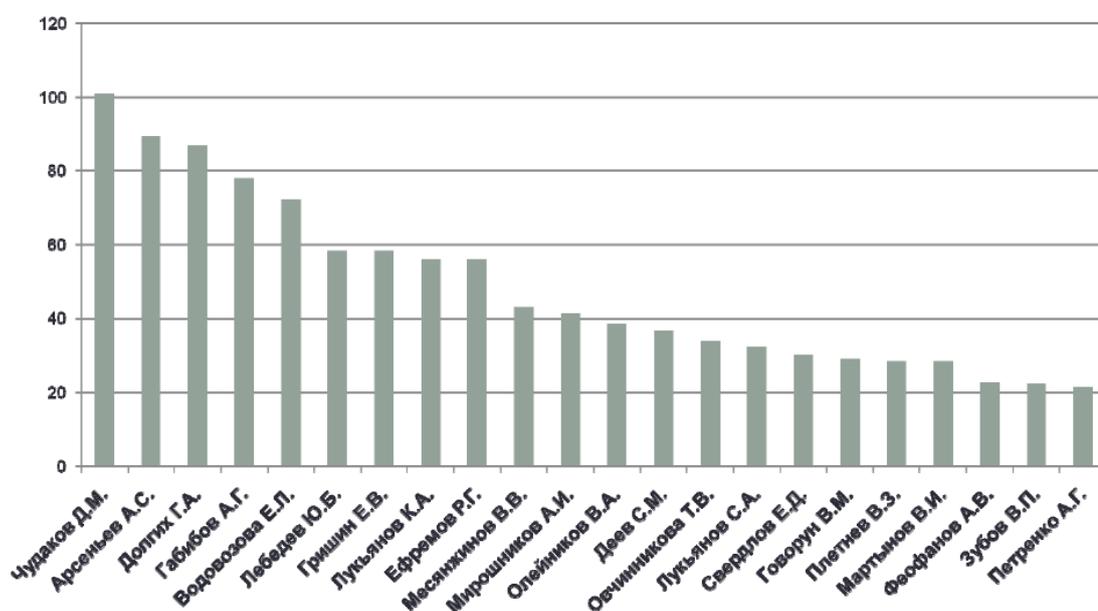
Журнал	IF	Кол-во статей
▪ Nature	36,28	2
▪ Nature Medicine	24,302	1
▪ Nature Methods	23,565	1
▪ Acta Crystallographica	14,103	4
▪ ACS Nano	12,062	3
▪ J. Amer. Chem. Soc.	10,677	1
▪ Nature Communications	10,015	1
▪ Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	9,737	3
▪ Trends Mol. Med.	9,571	1
▪ Ann. Rheum. Dis.	9,111	1

### Список наиболее высокорейтинговых публикаций

Ссылка	Журнал	Импакт-фактор
Shneider M.M., Buth S.A., Ho B.T., Basler M., Mekalanos J.J., Leiman P.G." PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike."// Nature. 2013 V.500 (7462): p.350-353.	Nature	38.597
D.K. Simanshu, R.K.Kamlekar, D.S.Wijesinghe, X.Zou, X.Zhai, S.K.Mishra, J.G.Molotkovsky, L.Malinina, E.H.Hinchcliffe, C.E.Chalfant, RE.Brown, D.J.Patel. Nonvesicular trafficking of ceramide-1-phosphate by a lipid transfer protein that regulates eicosanoid production. Nature 2013, 500(7463), 463-467.	Nature	36.28
Linnemann C, Heemskerk B, Kvistborg P, Kluin RJ, Bolotin DA, Chen X, Bresser K, Nieuwland M, Schotte R, Michels S, Gomez-Eerland R, Jahn L, Hombrink P, Legrand N, Shu CJ, Mamedov IZ, Velds A, Blank CU, Haanen JB, Turchaninova MA, Kerkhoven RM, Spits H, Hadrup SR, Heemskerk MH, Blankenstein T, Chudakov DM, Bendle GM, Schumacher TN. High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture. Nat Med., 2013, 19(11):1534-1541.	Nature Med.	24.302
Bolotin DA, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, Turchaninova MA, Zvyagin IV, Britanova OV, Chudakov DM. MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis. Nature Methods, 2013, 10(9):813-814.	Nature Methods	23.565

V.R. Samygina, B. Ochoa-Lizarralde, A.N. Popov, A. Cabo-Bilbao, F. Goni-de-Cerio, J.G. Molotkovsky, D.J. Patel, R.E. Brown, L. Malinina. Structural insights into lipid-dependent reversible dimerization of human GLTP. Acta Crystallographica D 2013, D69(Pt 4), 603–616.	Acta Crystallographica D	14.103
Pletneva NV, Pletnev VZ, Souslova E, Chudakov DM, Lukyanov S, Martynov VI, Arhipova S, Artemyev I, Wlodawer A, Dauter Z, Pletnev S. Yellow fluorescent protein phiYFPv (Phialidium): structure and structure-based mutagenesis. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2013 Jun;69(Pt 6):1005-12.	Acta Crystallogr D	14.103
Pletnev VZ, Pletneva NV, Lukyanov KA, Souslova EA, Fradkov AF, Chudakov DM, Chepurnykh T, Yampolsky IV, Wlodawer A, Dauter Z, Pletnev S. Structure of the red fluorescent protein from a lancelet (Branchiostoma lanceolatum): a novel GYG chromophore covalently bound to a nearby tyrosine. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2013 Sep;69(Pt 9):1850-60.	Acta Crystallogr D Biol Crystallogr	14.103
Mitkevich V.A., Schulga A.A., Trofimov A.A., Dorovatovskii P.V., Goncharuk D.A., Tkach E.N., Makarov A.A., Polyakov K.M. Structure and functional studies of the ribonuclease binase Glu43Ala/Phe81Ala mutant. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2013, 69: 991-996.	Acta Crystallogr D Biol Crystallogr	14.103
Mochalov K.E., Efimov, A.E., Bobrovsky A., Agapov, I.I., Chistyakov A.A., Oleinikov V., Sukhanova A., Nabiev I. (2013) Combined Scanning Probe Nanotomography and Optical Microspectroscopy: A Correlative Technique for 3D Characterization of Nanomaterials. - ACS Nano, 7(10), 8953-8962. DOI: 10.1021/nn403448p. IF=	ACS Nano	12.062
Aghayeva U.F., Nikitin M.P., Lukash S.V., Deyev S.M. Denaturation-Resistant Bifunctional Colloidal Superstructures Assembled via the Proteinaceous Barnase-Barstar Interface. ACS Nano. 2013. V. 7. No. 2. P. 950-961.	ACS Nano	12.062
Krylov N.A., Pentkovsky V.M., Efremov R.G. Nontrivial Behavior of Water in the Vicinity and Inside Lipid Bilayers as Probed by Molecular Dynamics Simulations. (2013) ACS Nano v. 7, N 10, p. 9428-9442.	ACS Nano	12.062
P.E. Volynsky, A.A. Polyansky, G.N. Fakhrutdinova, E.V. Bocharov, R.G. Efremov, Role of Dimerization Efficiency of Transmembrane Domains in Activation of Fibroblast Growth Factor Receptor 3, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 8105–8108.	JACS	10.677

## Рейтинг публикаций лабораторий с общим IF >20



## Международная деятельность в 2013 г.

Сколько ученых выехали за границу (страна, количество)			Сколько институт принял зарубежных ученых ( с указанием стран)	Сколько ученых выехали за счет принимающей стороны или при поддержке научных фондов, грантов	Сколько ученых участвовали в международных мероприятиях за рубежом (конференции симпозиумы и т.д.)	Количество отчетов, которые заслушивались на ученом совете института *
страна	количество	в том числе по безвалютному обмену				
Австрия	4	2	Германия 10	144	87	
Бельгия	7		Франция 6			
Великобритания	6		США - 15			
Германия	19		Великобритания -1			
Испания	7		Казахстан- 3			
Италия	8		Вьетнам 21			
Польша	2		Индия 2			
Китай	2		Португалия 1			
Индия	2		Бельгия 1			
Нидерланды	2		Украина 2			
Голландия	1		Ю.Корея 2			
Финляндия	3					
Канада	1					
США	14					
Франция	15					
Греция	2					
Вьетнам	1					
Израиль	5					
Швейцария	4					
Швеция	3					
Норвегия	1					
Белоруссия	1					
Украина	21				2	
Чехия	1					
Черногория	6					
Греция	1					
Кипр	4					
Канада	6					
Норвегия	1					
Португалия	1					
Ю.Корея	3					
Мексика	1					
Вьетнам	1					
Япония	2					

Всего

158

В текущем году международная деятельность Отдела проходила по следующим направлениям:

- 1- приглашение и прием иностранных ученых;
- 2- научные командировки сотрудников Института за рубеж;
- 3- научное сотрудничество Института
- 4- подготовка, перевод, оформление и редактирование тезисов докладов, контрактов, соглашений о научном сотрудничестве, меморандумов, отчетов и приглашений сотрудников, выезжающих за рубеж для участия в различных международных мероприятиях;
- 5- подготовка переводов материалов

1. По приглашению ИБХ в 2013 г. состоялось 63 рабочих визита иностранных ученых и специалистов в институт.

2. Состоялось 158 зарубежных научных командировок сотрудников Института;

3. Мероприятия, встречи, обсуждения:

18 марта - встреча с представителями Национальной академии наук США – презентация отчета «Уникальные взаимоотношения России и США в биологических науках и биотехнологии: недавний опыт и будущие направления» Г.Швейцер и Дж.Ледюк, обсуждение возможных путей реализации сотрудничества - 9 чел (США) и 45 чел. из института

4 июля – встреча с представителями КНР – научно-техническое сотрудничество и перспективы развития сотрудничества

6 – 11 июля - 38-ой конгресс ФЕБС «Механизмы в биологии», Санкт-Петербург

16 сентября – встреча делегации из Вьетнама во главе с Вице-премьером Правительства Вьетнама Нгуен Тхиен Няп. Обсудили перспективы сотрудничества по наиболее актуальным направлениям возможных совместных исследований (в соответствии с Соглашением о научном сотрудничестве и обмене учеными между РАН и Вьетнамской академией наук и технологий (ВАНТ) – 20 чел.

### III. Инновационная деятельность

реализованные разработки в производстве, в практике научных исследований,  
законченные в 2013 году.

#### Сведения об инновационной деятельности

Разработки и патенты	Количество
количество разработок, реализованных в производстве	-
количество разработок, реализованных в практике исследований	-
количество законченных в 2013 году исследований и разработок, переданных для практической реализации	4
количество разработок, реализованных в производстве	-
количество поданных патентов	13
количество полученных патентов	12
количество поддерживаемых патентов	107

1. Проведены доклинические испытания препарата миелоксен и первая фаза клинических испытаний (**Габиров А.Г.**)
2. Разработан Стандарт организации Системы Менеджмента Качества (СМК) СО ПЛЖ 17-09 «Порядок разработки новой продукции» издание 1, в котором описаны технологии получения геномодифицированных мышей и криоконсервации ранних эмбрионов. Данный Стандарт прошел проверку на соответствие международным требованиям ISO 9001:2008 при проведении реаккредитационного аудита СМК ПЛЖ и является ее составной частью. Сертификат НУ07/2419 от 16.02.2013. (**Телегин Г.Б. ФИБХ**)
3. Разработка: «Применение иммунокорректоров в лечении и профилактике атопического дерматита на основании изменения концентрации высоко- и низко-авидных антител класса G в сыворотке крови» реализована (**Пестов Н.Б.**) в:
  - Клинике им. В.Г. Короленко,
  - КВД №7 «Крылатский» ГБУЗ МНПЦДК ДЗМ,
  - КВД №8 «Останкинский» ГБУЗ МНПЦДК ДЗМ
4. Разработан лабораторный регламент на производство амидной формы пептида HLDF-6. (**Родионов И.Л. ФИБХ**)

## IV. Патентная деятельность

### Охрана интеллектуальной собственности в ИБХ РАН в 2013 году.

1. Название организации:

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук (ИБХ РАН)**

2	Подано заявок на выдачу патента РФ на изобретение	13	3	Получено положительных решений по заявкам на выдачу патента РФ на изобретения	6
4	Получено патентов РФ на изобретения	12	5	Прекращено патентование изобретений в РФ	5
6	Поддерживается патентов РФ на изобретения	107	7	Подано заявок на получение патентов на изобретения за границей	-
8	Подано заявок на получение патентов на изобретения в страны СНГ	-	9	Получено патентов на изобретения за границей	-
10	Получено патентов на изобретения в странах СНГ	-	11	Поддерживается за границей патентов на изобретения	-
12	Поддерживается патентов на изобретения в странах СНГ	-	13	Прекращено патентование изобретений за границей	-
14	Прекращено патентование изобретений в странах СНГ	-	15*	Продано лицензий в РФ	-
16	Заключено с зарубежными организациями соглашений (контрактов) с использованием объектов интеллектуальной собственности	-	17*	Заключено с организациями стран СНГ соглашений (контрактов) с использованием объектов интеллектуальной собственности	-
18	Заключено договоров о переуступке прав	-	19	Подано заявок на регистрацию товарных знаков в РФ	-
20	Получены свидетельства на товарный знак РФ	-	21	Получены свидетельства на товарный знак за границей	-
22	Подано заявок на выдачу патента РФ на промышленный образец	-	23	Получено патентов РФ на промышленные образцы	-
24	Получено патентов на промышленные образцы за границей	-	25	Подано заявок на полезные модели	-
26	Получено патентов на полезные модели	-	27	Получено свидетельство гос. регистрации программ для ЭВМ	-
28	Подано заявок на регистрацию программ для БД	-	29	Подано заявок на регистрацию топологий ИМС	-
30	Продано «НОУ-ХАУ»	-	31	Численность патентной службы	2

**В 2013 году было подано в ФИПС 13 заявок на выдачу патентов Российской Федерации на изобретения:**

1. № 2013109368

«Рекомбинантные плазмидные ДНК, кодирующие гибридные полипептиды со свойствами красного флуоресцентного белка mCherry, для продуцирования гибридных флуоресцентных белков в *Escherichia coli*», приоритет 04.03.2013г, авторы Петровская Л.Е., Шингарова Л.Н., Гапизов С.Ш., Крюкова Е.А., Болдырева Е.Ф., Якимов С.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.

2. № 2013109369

«Рекомбинантная плазмидная ДНК pET3.54, кодирующая полипептид FN3.54, взаимодействующий с фактором некроза опухолей человека, и штамм бактерий *Escherichia coli*- продуцент полипептида FN3.54, взаимодействующего с фактором некроза опухолей человека», приоритет 04.03.2013, авторы Шингарова Л.Н., Петровская Л.Е., Крюкова Е.А., Болдырева Е.Ф., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.

3. № 2013113887

«Способ формирования многофункциональных микросистем», приоритет 28.03.2013г, авторы Генералова А.Н., Суханова Т.В., Сизова С.В., Манохина В.В., Мочалов К.Е., Олейников В.А., Набиев И.Р.

4. № 2013113891

«Анальгетический пептид из морской анемоны *URTICINA GREBELNYI*», приоритет 28.03.2013г, авторы Козлов С.А., Осмаков Д.И., Андреев Я.А., Кошелев С.Г., Гришин Е.В., Дьяченко И.А., Бондаренко Д.А., Мурашов А.Н.

5. №2013116719

«Рекомбинантная плазмидная ДНК pEst877, детерминирующая экспрессию полипептида с активностью эстеразы *Psychrobacter cryohalolentis* K5 на поверхности клеток *Escherichia coli*, и штамм бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS\pEst877 продуцент полипептида с активностью эстеразы *Psychrobacter cryohalolentis* K5 на поверхности клеток», приоритет 12.04.2013г, авторы Петровская Л.Е., Крюкова Е.А., Новотоцкая-Власова К.А., Ривкина Е.М., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.

6. № 2013120607

«Способ косвенной оценки чувствительности клеток рака легкого к доксорубину на основании уровней экспрессии маркерных генов и набор для его осуществления», приоритет 07.05.2013, авторы Кашкин К.Н., Барсова Е.В., Шипулин Г.А., Чеканова Т.А., Пудова Е.А., Скапцова Н.В., Потапов В.К., Копанцев Е.П., Зиновьева М.В., Виноградова Т.В.

7. №2013136509

«Нуклеиновая кислота, обладающая активностью короткой интерферирующей РНК, вектор, содержащий данную нуклеиновую кислоту, функционально соединенную с последовательностями регуляции транскрипции, и способ их применения для подавления пролиферации клеток аденокарциномы поджелудочной железы человека», приоритет 05.08.2013г, авторы Свирщевская Е.В., Смирнова Е.В., Рязанцев Д.Ю., Зубков Д.А., Бойко А.А.

8. № 2013120609

«Способ косвенного определения чувствительности клеток рака легкого к цисплатину на основании уровней экспрессии маркерных генов и набор для его осуществления », приоритет 07.05.2013, авторы Кашкин К.Н., Барсова Е.В., Чеканова Т.А., Шипулин Г.А. Пудова Е.А., Скапцова Н.В., Потапов В.К., Копанцев Е.П., Зиновьева М.В., Виноградова Т.В.

9. № 2013137784

« Нуклеиновая кислота, кодирующая основанный на FRET дальне-красный биосенсор для измерения активности каспазы 3 внутри клеток» приоритет 13.08.2013, авторы Лукьянов К.А., Злобовская О.А.

10. № 2013150712

« Способ получения рекомбинантного аналгетического пептида» приоритет 14.11.2013, авторы Есипов Р.С., Степаненко В.Н., Василевский А.А., Королькова Ю.В., Гришин Е.В.

11. № 2013153711

« Способ выявления белков в разных типах клеток млекопитающих и человека с помощью флуоресцеин-5- изотиоционата на микроскопическом уровне» приоритет 04.12.2013 авторы Шишова К.В., Лаврентьева Е.А., Зацепина О.В.

12. №

«Элемент демпфера пульсаций» приоритет 00.12.2013 автор Ульяшин В.В. (гр.Назимова)

13. №

«Адаптивное устройство демпфирования пульсаций» приоритет 00.12.2013 автор Ульяшин В.В. (гр.Назимова)

#### **В 2013 году было получено 6 решений о выдаче патентов Российской Федерации:**

1. по заявке № 2011143071
2. по заявке № 2012126841
3. по заявке № 2012126840
- i. по заявке № 2011152464
- ii. по заявке № 2011114502
6. по заявке № 2012110816

#### **В 2013 году было получено 12 патентов Российской Федерации на изобретение.**

1. № 2469098 «Способ оценки эффективности терапии рака мочевого пузыря человека методом ПЦР в режиме реального времени и набор для его осуществления» авторы Заболотнева А.А., Шегай П.В., Гайфуллин Н.М., Русаков И.Г., Алексеев Б.Я., Буздин А.А.

2 2469323 «Способ диагностики рака мочевого пузыря ( варианты) и набор для его осуществления» авторы: Заболотнева А.А., Шегай П.В., Гайфуллин Н.М., Русаков И.Г., Алексеев Б.Я., Буздин А.А.

3 № 2470301 «Способ диагностики рака мочевого пузыря с помощью онкомаркера KIFC1(варианты) и набор для его осуществления» авторы: Заболотнева А.А., Шегай П.В., Гайфуллин Н.М., Русаков И.Г., Алексеев Б.Я., Буздин А.А.

4 № 2475497 «Полипептид из морской анемоны HETERACTis crispа, обладающий анальгетическим действием» авторы: Козловская Э.П., Монастырская М.М., Гладких И.Н., Табакмахер В.М., Кривошапка О.Н., Козлов С.А., Османов Д.И., Андреев Я.А., Кошелев С.Г., Гришин Е.В.

5. № 2473561 «Способ блокирования сигнального пути, активируемого фактором Wnt8 в клетках животных с помощью белков семейства NOGGIN» авторы: Байрамов А.В., Ерошкин Ф.М., Мартынова Н.Ю., Ермакова Г.В., Серебрякова М.В., Соловьева Е.А., Зарайский А.Г.

6 № 2474426 «Простаминаы и их аналоги,обладающие нейрозащитным действием» авторы: Безуглов В.В, Бобров М.Ю., Грецкая Н.М., Серков И.В., Зинченко Г.Н., Акимов М.Г..

7 № 2480524 «Конструкция на основе белковой пары барназа-барстар и способ ее получения» авторы: Никитин М.П., Здобнова Т.А., Стрёмовский О.А., Лукаш С.В., Деев С.М.

8. № 2486243 «Полинуклеотид, кодирующий мутантную рекомбинантную IgA1 протеазу Neisseria meningitides серогруппы В, рекомбинантная плазмидная ДНК, содержащая указанный полипептид, клетка-хозяин, содержащая указанную плазмидную ДНК, рекомбинантная IgA1 протеаза Neisseria meningitides серогруппы В, способ получения зрелой формы IgA1 протеазы» авторы: Румш Л.Д., Серова О.В., Зинченко А.А., Аллилуев А.П., Козлов Л.В., Котельникова О.В., Жигис Л.С., Ягудаева Е.Ю., Андина С.С., Анохина И.В., Зуева В.С., Гордеева Е.А., Мелихова Т.Д., Нокель Е.А.

9. № 2491950 «Лигнан, обладающий анальгетическим действием» авторы: Козлов С.А., Осмаков Д.И., Андреев Я.А., Кошелев С.Г., Гришин Е.В., Дьяченко И.А., Бондаренко Д.А., Мурашев А.Н.

10. № 2498996 «Химерный белок, являющийся флуоресцентным биосенсором для одновременной детекции пероксида водорода и фосфатидилинозитол-3,4,5, трифосфата, нуклеиновая кислота, кодирующая такой белок, кассета экспрессии эукариотическая клетка-хозяин» авторы: Белоусов В.В, Мишина Н.М., Чудаков Д.М.

11 № 2499052 «Способ выделения рекомбинантных белков» авторы: Гаспарян М.Э., Бычков М.Л., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Ким Я.В.

12 № 2445768 «Способ получения генетически модифицированных растений каланхоэ, экспрессирующих ген цекропина Р1» авторы: Захарченко Н.С., Лебедева А.А., Бурьянов Я.И.

**В 2013 году поставили на инвентарный учет нематериальных активов 14 патентов РФ на изобретение.**

**11.12.2013г**

### **Свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ**

1. Крылов Н.А., Чугунов А.О., Волынский П.Е., Ефремов Р.Г., Антонов М.Ю.  
**Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2013616961**  
«Программное обеспечение для автоматизированной сборки гидратированных липидных бислоев и белок-мембранных систем», Заявка № 2013615262, дата поступления 20.06.2013 г., Зарегистрировано в Реестре программ для ЭВМ 29.07.2013 г.

2. Чугунов А.О., Ефремов Р.Г. **Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2013618122 «темМар»**, Заявка № 2013616005, дата поступления 12.07.2013 г., Зарегистрировано в Реестре программ для ЭВМ 30.08.2013 г.

Лаборатория биологических испытаний ФИБХ РАН получила официальное международное признание соответствия принципам Надлежащей Лабораторной Практики Организации экономического сотрудничества и развития при выполнении неклинических исследований по медицинской безопасности. Инспектирование лаборатории осуществляла Словацкая национальная служба по аккредитации. В настоящее время эта лаборатория является первой и пока единственной в РФ.

 **SNAS** SLOVAK NATIONAL ACCREDITATION SERVICE  
Karloveská 63, 840 00 Bratislava 4, Slovak Republic

**STATEMENT  
OF GLP COMPLIANCE**

**No. G-044**

**Slovak National Accreditation Service certifies**

conformity with GLP according to the Act No. 67/2010 Coll., the OECD Principles of GLP and Directive 2004/10/EC of European Parliament and of the Council, in the test facility:

**Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic  
Chemistry (Branch), RAS  
Biological Testing Laboratory**  
Prospekt Nauki 6, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia  
ID Number: 1037739009110

**Area of expertise:** Toxicity studies.

The above mentioned test facility is included in the Slovak National GLP Compliance Program and is inspected by Slovak National Accreditation Service on a regular basis.

**Prof. Arkady N. Murashev**, Head of Biological Testing Laboratory, is the statutory body of the test facility, who manages and represents it and acts on its behalf.

This statement is issued on 15 July 2013 and is valid until 15 July 2016

Bratislava 15.07.2013

   
Martin Senčák  
Director

**V. Сведения о выполнении научно-исследовательских работ ИБХ РАН в 2013 г.  
по областям и направлениям науки в соответствии с  
Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на  
2013-2020 годы**

Таблица 1

Номер и наименование направления фундаментальных исследований Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы	Наименование тем исследований	Институты-исполнители	Результаты (в привязке к ожидаемым результатам по Программе)
1	2	3	4
50. Биология развития и эволюция живых систем	Новые белки - регуляторы раннего развития центральной нервной системы позвоночных	ИБХ РАН	Впервые установлено, что белок Noggin4 обладает способностью ингибировать канонический и активировать неканонический Wnt-сигнальные каскады. Показано, что гены Ag1 активируются в клетках регенерационной бластемы при регенерации хвоста и задней конечности у головастика шпорцевой лягушки. С помощью технологии высокопроизводительного секвенирования начат поиск генов, регулируемых цитоскелетным белком Zuxin в процессе развития ЦНС.
56. Физиология и биохимия растений, фотосинтез, взаимодействие растений с другими организмами	Изучение молекулярных механизмов взаимодействия в системе фитопатоген - растение-хозяин	ИБХ РАН	Получены гибридные линии, продуцирующие моноклональные антитела, специфически реагирующие с фрагментом белка 1a репликазы вируса желтухи свеклы, получены и аффинно очищены соответствующие МА. Проверена их специфичность методами ИФА и иммуноблоттинга. Проведена временная экспрессия двух гидрофобных участков репликазы 1a ВЖС в растениях <i>Nicotianabenthiana</i> . Показаны эффекты реорганизации эндоплазматического ретикулума и образования мобильных мембранных глобул, что доказывает, что процесс репликации вируса в клетке происходит с участием клеточных мембранных структур и сети актиновых филаментов.
57.	Подготовка научных	Учебно-	В 2013 г. Учебно-научный центр (УНЦ) ИБХ РАН участвовал в выполнении заданий

<p><b>Структура и функции биомолекул и надмолекулярных комплексов, протеомика, биокатализ</b></p>	<p><b>кадров по физико-химической биологии и биотехнологии</b></p>	<p>научный центр (УНЦ) ИБХ РАН</p>	<p>Программы целевых расходов Президиума РАН «Поддержка молодых ученых» в рамках проекта «Поддержка деятельности Научно-образовательного центра ИБХ РАН». В соответствии с учебными программами в 2013 году были проведены теоретические и практические занятия со студентами и аспирантами 11 специализированных кафедр 9 факультетов 7 ведущих вузов, среди которых:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>кафедра биоорганической химии и кафедра биофизики биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова;</li> <li>- кафедра фармации факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В.Ломоносова;</li> <li>- кафедра физико-химической биологии и биотехнологии факультета биологической и медицинской физики Московского физико-технического института;</li> <li>- кафедра биотехнологии и кафедра химии и технологии биологически активных соединений факультета биотехнологии и органического синтеза Московского государственного университета тонких химических технологий им. М.В.Ломоносова;</li> <li>- кафедра химии и технологии биомедицинских препаратов факультета химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева;</li> <li>- кафедра биотехнологии факультета биотехнологии и промышленной экологии Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева;</li> <li>- кафедра биоорганической химии и биотехнологии биолого-химического факультета Московского педагогического государственного университета;</li> <li>- кафедра биотехнологии фармацевтического факультета Первого московского государственного медицинского университета им. И.М.Сеченова;</li> <li>- кафедра генетики, микробиологии и биотехнологии биологического факультета Кубанского государственного университета.</li> </ul> <p>В 2013 г. в УНЦ ИБХ РАН прошли обучение 220 студентов, из них 95 выполнили курсовые и дипломные работы.</p> <p>С 11 по 15 февраля 2013 г. Учебно-научным центром ИБХ РАН при поддержке РФФИ и Программы целевых расходов Президиума РАН «Поддержка молодых ученых» была проведена юбилейная XXV международная зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", посвященная 30-летию Учебно-научного центра ИБХ РАН. На заседаниях Школы присутствовало более 300 слушателей из различных вузов, в том числе из МГУ им. М.В. Ломоносова, МФТИ, МИТХТ им. М.В. Ломоносова, МГПУ и др., молодыми учеными – лучшими выпускниками Учебно-научного центра - было представлено 42 устных доклада и 75 стендовых сообщений. В рамках Школы был проведен конкурс на лучшую научно-исследовательскую работу, в котором приняли участие 78 молодых ученых.</p>
<p><b>57. Структура и функции биомолекул и</b></p>	<p><b>Разработка фундаментальных принципов конструирования мультифункциональн</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>Сконструирован и охарактеризован новый полностью генетически кодируемый иммунофототоксин на основе белка miniSOG и анти-HER2/neu-миниантитела. Показано, что сконструированный иммунофототоксин обладает высокоспецифичной фотоиндуцированной цитотоксичностью в отношении HER2/neu-положительных клеток аденокарциномы молочной железы человека SKBR3 (IC<sub>50</sub> 160 нМ), в 10 раз превышающей цитотоксичность</p>

<b>надмолекулярных комплексов, протеомика, биокатализ</b>	<b>ых соединений направленного действия для диагностики и терапии социально значимых заболеваний.</b>		<p>химических конъюгатов низкомолекулярных фотосенсибилизаторов с теми же мини-антителами.</p> <p>Продемонстрирована необычная стабильность бифункциональных магнитно-флуоресцентных коллоидных микро- и наноконструкций, полученных на основе белковых адапторных модулей, в широком диапазоне экстремальных для молекул белков денатурирующих условий (рН, температура, высокая ионная сила, хаотропные агенты и др.) Сравнение системы барназа-барстар с другими системами самосборки на основе белок-белковых взаимодействий показало ее значительное преимущество при сборке надмолекулярных структур в жестких условиях.</p> <p>Для высокоточного иммуноанализа и исследований редких событий в нанопротеомике предложена высокоаффинная белковая пара барстар :барназа (KD ~ 10 fM) как альтернатива традиционно используемой и практически универсальной высокоаффинной паре [стрепт]авидин-биотин (KD ~ 1 fM). Использование пары барстар-барназа позволило значительно снизить существенный фон за счет неспецифического связывания с твердой подложкой, характерный для компонентов пары [стрепт]авидин:биотин.</p>
	<b>Разработка и применение технологий флуоресцентного мечения живых систем</b>	ИБХ РАН	<p>Впервые охарактеризованы внутриклеточные физиологические эффекты, вызываемые в раковых клетках генетически кодируемыми фотосенсибилизаторами: а) miniSOG на плазматической мембране, в матриксе митохондрий и в составе хроматина; б) KillerRed на поверхности лизосом.</p> <p>Создан генетически кодируемый флуоресцентный сенсор НуPer-3 - улучшенная версия сенсора пероксида водорода НуPer с высокым динамическим диапазоном и быстрым восстановлением. Разработаны методы синтеза для ряда красителей – флуоресцентных аналогов природного хромо-фора GFP, с различными ауксохромными заместителями. Предложены методы их применения в качестве флуоресцентных красителей для биологии.</p>
	<b>Структура, динамика, механизмы действия и биологическая функция белков и пептидов</b>	ИБХ РАН	<p>Методом ЯМР получена пространственная структура гомодимера трансмембранного домена рецептора фактора роста фибробластов человека FGFR3, предложен механизм его активации в норме и при патологиях. Создана высокоэффективная система бесклеточной продукции фрагмента трансмембранного домена белка-предшественника бета-амилоида APP с металл-связывающим участком. Разработана методика измерения энергии димеризации мембранных белков в мицеллярных средах посредством гетероядерной ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Разработана экспериментальная методика тестирования MD траекторий с количественными характеристиками их точности. Впервые создан экспериментальный метод тестирования динамики боковых цепей белка, ответственных за внутри- и межмолекулярные взаимодействия. Методом рентгеновской кристаллографии получена пространственная структура бактериородопсина из грамположительных бактерий <i>Exiguobacterium sibiricum</i> (ESR). Методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения проведено исследование димеризации и олигомеризации трансмембранного домена гем-агглютинина вируса гриппа. Методами ЯМР определена пространственная структура и охарактеризована динамика липид-транспортующего белка из семян чечевицы (Lc-LTP2).</p>
	<b>Синтез пептидов - агонистов</b>	ФИБХ РАН	<p>Исследована активность селективного агониста неопиоидного рецептора бета-эндорфина синтетического пептида TPLVTLFK, соответствующего фрагменту 12-19 бета-эндорфина</p>

	<p><b>неопиоидного рецептора бета-эндорфина и изучение их активности при действии различных экстремальных факторов</b></p>		<p>(авторское название - октарфин), на модели инфаркта миокарда у крыс. Установлено, что при интраназальном введении в дозах 2-20 мкг/кг один раз в сутки в течение 7 дней после экспериментального инфаркта миокарда (ЭИМ) пептид оказывает выраженное противоишемическое действие, улучшает коронарный кровоток, повышает сократительную активность миокарда, снижает интенсивность перекисного окисления липидов, способствует повышению уровня антиоксидантной защиты. По выявленным фармакологическим эффектам октарфин был сопоставим со стандартным препаратом - антигипоксантом Рибоксином, а по некоторым показателям (улучшение коронарного кровотока, стимуляция антиоксидантной защиты) даже его превосходил. Таким образом, октарфин потенциально пригоден для разработки на его основе препарата для лечения ишемической болезни сердца, перенесенного инфаркта миокарда и миокардиодистрофии (снижения функциональной способности сердечной мышцы).</p>
	<p><b>Механизмы посттрансляционных модификаций флуоресцентных белков семейства GFP</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>С помощью абсорбционной спектроскопии выявлены промежуточные формы в процессе созревания различных флуоресцентных белков. Охарактеризованы переходные состояния хромофора, соответствующие этим формам. Проведена кристаллизация фотоконвертируемого флуоресцентного белка.</p>
	<p><b>Исследование пространственной организации и структурно-функциональной взаимосвязи белков методами рентгеноструктурного анализа и биоинформатики</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>Методами рентгеноструктурного анализа высокого разрешения и сайт-направленного мутагенеза установлены пространственные структуры и изучена структурно-функциональная взаимосвязь серии новых флуоресцентных белков (ФБ) зеленого, желтого и красного спектральных диапазонов: желтый PhiYFPv (<math>\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{эм}}=524/537</math> нм), зеленый IaGFP (<math>\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{эм}}=502/511</math> нм), красные IaRFP, IaRFP-del_S83, IaRFPdem (<math>\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{эм}}=521/592</math> нм). Разрешение 2.05, 1.7, 2.3, 1.9, 1.9 А, соответственно.</p>
	<p><b>Иммуноактивные синтетические фрагменты белков для разработки новых подходов к иммунопрофилактике, лечению и диагностике нейродегенеративных и онкологических заболеваний</b></p>	<p>ИБХ РАН, Институт биофизики клетки РАН, Пущино, ФГУ Научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена,</p>	<p><b>Осуществлен синтез</b> фрагментов рецептора конечных продуктов гликозилирования (RAGE), рецептора нейтрофинов (p75), прионного белка, нуклеофозмина и сурвивина. Получены антитела с помощью синтетических пептидов.</p> <p><b>Изучен механизм</b> иммунопротективного действия пептидного фрагмента прионного белка 95-123 и антител к нему в экспериментальной модели болезни Альцгеймера.</p> <p><b>Выявлены синтетические фрагменты</b> рецептора конечных продуктов гликозилирования (RAGE), рецептора нейтрофинов (p75) и новые фрагменты прионного белка, обладающие иммунопротективной активностью в экспериментальной модели болезни Альцгеймера.</p> <p><b>Показана способность</b> противопептидных антител выявлять различные структурные формы сурвивина и нуклеофозмина</p>

		Москва	
	<b>Протеомно-генетический анализ защитных пептидов беспозвоночных и растений с целью идентификации новых веществ, взаимодействующих с функционально-важными компонентами клеточной мембраны</b>	ИБХ РАН	Разработана клеточная тест-система, основанная на регистрации $Ca^{2+}$ -ответов клеток на активирующие стимулы, пригодная для быстрого и эффективного скрининга природных и синтетических соединений, влияющих на функциональную активность рецепторов $\gamma$ TRPA1. Проведен масштабный скрининг природных объектов по отношению к рецепторам $\gamma$ TRPV1, $\delta$ TRPV3, $\gamma$ TRPA1, $\gamma$ ASIC3, определены активные молекулы. Охарактеризованы соединения, обладающие специфичным действием на протончувствительные нейрональные рецепторы ASIC3, и проявляющие анальгетическую активность в тестах <i>in vivo</i> . Проведены исследования структуры генов, а также биологической активности модульных токсинов пауков и защитных пептидов растений.
	<b>Структура и функции белков и надмолекулярных комплексов ядрышек клеток млекопитающих в норме и при патологиях</b>	ИБХ РАН, лаборатория структурной биохимии	С помощью полученных нами ранее противопептидных антител к белку ядрышка нуклеофозмину/B23 показано, что клетки глии и нейроны в мозге новорожденных крысят и культурах тканей принципиально различаются по содержанию и структурным формам нуклеофозмина. Впервые показано, что содержание нуклеофозмина в клетках глии несоизмеримо больше, чем в нейронах, а основной формой белка является SDS-устойчивая олигомерная форма, тогда как мономерная форма нуклеофозмина присутствует лишь в следовых количествах. Разными методами (аффинной хроматографией, ко-иммунопреципитацией, FRET и масс-спектрометрией) доказано, что SURF6 человека ассоциирован с многофункциональными белками нуклеофозмином и нуклеолином, ко-фактором РНК полимеразы I UBF, фактором процессинга рРНК EBP2, и эволюционно-консервативным белком NOP52, который необходим для поздних стадий созревания рРНК. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что SURF6 человека является многофункциональным белком, принимающим участие в регуляции транскрипции рДНК, процессинге рРНК и сборке рибосом. Установлено, что повышение содержания SURF6 в клетках HeLa не вызывает клеточной гибели, но задерживает клеточную пролиферацию в результате накопления клеток в G2 периоде. Показано, что у мышей с ртуть-индуцированным аутоиммунным процессом аутоантитела к ядерным аутоантигенам способны проникать внутрь ооцитов и клеток гранулезы яичников на разных стадиях созревания фолликулов, где они ко-локализуются с белком ядрышка фибрилларарином. Это сопровождается увеличением уровня сывороточных иммуноглобулинов класса IgG1 в 5 раз и класса IgE в 3 раза по сравнению с мышами из контрольной группы, инъецированных 0.9% NaCl то же время. Впервые разработаны подходы для выявления разных форм РНК в «ядрышках» зрелых (преовуляторных) ооцитов млекопитающих с помощью флуоресцентных красителей акридинового оранжевого (выявляет одноцепочечную РНК) и пиронина Y (выявляет

			<p>двухцепочечную РНК). Установлено, что обе формы РНК является биохимическими компонентами «ядрышек» ооцитов. Впервые разработан универсальный способ выявления внутриклеточных белков в разных типах клеток млекопитающих с помощью флуоресцеин-5-изотиоционата, позволяющий не только локализовать, но и производить сравнительный количественный анализ содержания белкового компонента.</p> <p>Проведен комплексный анализ фенотипа и активности ядрышек в клетках HeLa в условиях окислительного стресса, индуцированного сублетальными дозами H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Разными методами выявлено изменение функциональной активности ядрышка, включающее подавление транскрипции рДНК, уменьшение содержания РНК в ядрышках, изменения в локализации РНК-связывающих белков фибрилларина и нуклеофозмина. Динамические свойства фибрилларина и нуклеофозмина <i>in vivo</i> в условиях окислительного стресса изучены методом FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) в сочетании с EGFP-маркированием белков конфокальной лазерной микроскопией. В совокупности полученные результаты позволили заключить, что FRAP - наиболее чувствительный метод для выявления реакции ядрышковых белков на стрессовые воздействия, а фибрилларин является ранним сенсором окислительного стресса в клетках HeLa</p>
	<p><b>Исследование механизма деградации антигенов ферментами, антителами и протеасомным комплексом в норме и при патологических состояниях организма. Структурно-функциональные особенности биокатализаторов.</b></p>	ИБ РАН	<p>Создан антидот против фосфорорганических отравляющих веществ пролонгированного действия на основе рекомбинантной бутирил-холинэстеразы человека.</p> <p>Исследованы механизмы деградации антигенов HIV I антителами и ферментами.</p>
	<p><b>Синтез новых модуляторов клеточной активности на основе нейрוליпинов и их производных, несущих</b></p>	ИБХ РАН	<p>При выяснении возможных механизмов нейрозащитных свойств природных ацилдофаминов в моделях нейронной сети первичной культуры гиппокампа при моделировании гипоксии установлено, что ацилдофамины способны нормализовать электрическую активность нейронов, нарушенную введением глутамата через их взаимодействие с каннабиноидными рецепторами первого типа. Синтезированы новые модуляторы клеточной активности с отрицательно заряженной функциональной группой (ацилтаурины, конъюгаты эндогенных липидов с гамма-аминомасляной кислотой). Установлено, что амид простагландина E<sub>2</sub> и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) обладает нейрозащитными свойствами и способен усиливать локальный мозговой кровоток только в условиях глобальной преходящей ишемии, причём</p>

	<p><b>заряженную группу</b></p>		<p>этот эффект реализуется по ГАМК-эргическому механизму. Сочетание данных видов активности позволяет рассматривать это соединение в качестве прототипа нового противоишемического средства.</p>
	<p><b>Структурно-функциональные исследования новых белков и пептидов. Разработка на их основе новых методов диагностики и лечения социально-значимых заболеваний.</b></p>	<p>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)</p>	<p>1. Разработан план доклинических исследований ЛС на основе пептида HLDF-6 и лабораторный регламент его получения. Нарботаны образцы фармацевтической субстанции (ФС) и ЛС. Проведенное изучение хронической, субхронической токсичности, аллергенности и мутагенности ЛС показало, что изучаемый препарат не токсичен, не обладает аллергенными и мутагенными эффектами и может быть рекомендован для проведения дальнейших исследований.</p> <p>2. Проведенное с помощью сравнительного электрофоретического анализа и вестерн-блот гибридизации суммарных белковых пулов струк-турированных оболочек яблока (склера, сетчатка) изучение влияния растворов искусственной слезы, содержащей сбалансированные концентрации лактоферрина, на устойчивость PEDF к действию протеолитических ферментов показало, что белок лактоферрин не оказывает существенного влияния на устойчивость PEDF к расщеплению собственными протеиназами организма при низких степенях близорукости.</p> <p>3. Показано, что DYNLRB1 является активатором NDP-киназы А. Максимальный уровень активации NDP-киназы А в присутствии DYNLRB1 пре-вышал контрольный в 9,4 раза. При определении зависимости ферментативной активности NDP-киназы А от концентрации DYNLRB1 было показано, что уровень активации фермента дос-тигал полумаксимального значения при молярном соотношении белков 1:30 соответственно. Также показано, что DYNLRB1 вызывает активацию NDP-киназы В, фактора транскрипции <i>c-myc</i> онкогена, сопоставимую с уровнем активации NDP-киназы А. Уровни активации мутантов NDP-киназы А P96S (<i>Killer-of-Prune</i> мутация (<i>awd<sup>k-pn</sup></i>) <i>Drosophilamelanogaster</i>) и S120G (мутация, вызывающая развитие нейробластомы человека) составили соответственно 50% и 25% от уровня активации белка дикого типа. DYNLRB1 также увеличивает уровень аутофосфорилирования NDP-киназы А, который определяли по включению [<sup>32</sup>P] в состав белка в реакции с [<sup>32</sup>P]АТФ. Уровень аутофосфорилирования NDP-киназы А в присутствии DYNLRB1 превышал контрольный в 5 раз.</p> <p>4. В условиях развития воспалительного процесса, инициированного низкой дозой липополисахарида, в обонятельной выстилке крысы исследован уровень синтеза двух хитиназных белков млекопитающих Ymlolf и AMCcase. При этом впервые обнаружен и идентифицирован новый укороченный вариант транскрипта гена ChiA (sAMCase). Поскольку при доказанных показателях хронизации инфекционно-воспалительного процесса продемонстрировано, что новая сплайсформа гена AMCcase (ChiA) ассоциирована только с острофазовой стадией воспалительного ответа организма, высказано предположение, что она может быть использована в качестве биомаркера прогнозируемости рецидивирующего течения болезни.</p> <p>5. Получен рекомбинантный гапонин в количестве и с качеством, соответствующим требованиям кристаллизационного эксперимента (1 мл белка с концентрацией 10 мг/мл). С использованием автоматизированной системы кристаллизации проведен широкий скрининг</p>

			<p>первичных условий при двух температурах. Установлены условия, обеспечивающие мелкозернистые кристаллы. На основе клеточных линий Namalwa, TNP-1, HeLa получены новые клеточные линии с измененными уровнями экспрессии гапонина и соответствующие конт-рольные линии. Показано, что в клетках, экспрессирующих киРНК к гапонину, уровень его мРНК и белка был снижен более, чем на 50%; а в клетках, сверхэкспрессирующих гапонин дикого типа или слитый с GFP гапонин, экспрессия гапонина превышает более чем в 10 раз уровень эндогенного белка. С помощью кПЦР в реальном времени с использованием панели клеточных ли-ний с измененными уровнями гапонина исследо-ваны профили экспрессии широкого спектра белков в нормальных условиях и в условиях окислительного и метаболического стрессов и показано, что наибольший эффект гапонин оказывает на интерферон-стимулируемые гены (IRF1, Smad7, ICAM1, c-Fos).</p>
	<p><b>Молекулярный дизайн и синтез низкомолекулярных биологически активных соединений и их аналогов</b></p>	<p>ИБХ РАН; Университет Альберты, Эдмонтон, Канада; Центр нуклеиновых кислот, Оденсе, Дания; Институт физико-органической химии, Минск; Факультет наук о материалах МГУ</p>	<p>Показана применимость стабилизированных карбкатионов в качестве масс-спектрометрических меток для модификации поверхностей и мече-ния биомолекул - олигонуклеотидов и пептидов.</p> <p>Получены функциональные производные флуо-ресцентных красителей для синтеза флуоресцентных ДНК-зондов и флуоресцентной моди-фикации белков.</p> <p>Разработан реагент, содержащий активированный эфир, флуоресцентный краситель и алифати-ческую азидогруппу. Этот реагент позволяет проводить контролируемое введение азидогрупп в молекулу белка и последующую модификацию белка с помощью клик-реакции с алкинами.</p> <p>Получены флуоресцентные производные нуклео-зидов с полициклическими гидрофобными замес-тителями, проявляющие активность против обо-лочечных вирусов.</p> <p>В синтезе полициклических каркасных структур с заданными фотофизическими и фотохими-ческими свойствами разработаны методы синтеза разнооб-разных иминов 1,4,5,6,7,7-гексахлор-5-норборнен-2,3-дикарбоновой кислоты и 5-норборнен-2,3-дикарбоновой кислоты. Продолжена разработка удобных и препаратив-ных методов синтеза трехантенных псевдопеп-тидов – производных карбоксиметил(олиго)глицинов.</p> <p>Для получения флуоресцентных производных различных экотоксикантов отработаны условия синтеза 7-гидроксикумаринов, содержащих в 4 положении кумаринового ядра хлорметильную, бромметильную, азидометильную и аминотетиль-ную группы. Изучаются условия синтеза соответ-ствующих конъюгатов.</p> <p>Отработаны условия синтеза ключевого соедине-ния класса фенилдигидронафталина – диметило-вого эфира 1,2-дигидро-6,7-дигидрокси-1-(3,4-ди-гидроксифенил)нафталин-<i>транс</i>-1,2-дикарбо-новой кислоты. Ведется целенаправленный поиск защитных групп на фенольные гидроксигруппы с целью дальнейших трансформаций этого соединения.</p>
	<p><b>Фундаментальные аспекты биоконъюгации</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>Проводилась работа в области флуоресцентных красителей для геномики и протеомики и флуоресцентных противовирусных соединений нуклеозидной природы с ненуклеозидным механизмом действия. Разработанные красители пригодны для получения флуорогенных ДНК-зондов и мечения синтезируемых клеткой белков. Среди модифицированных нуклеозидов проводился поиск противовирусных соединений с высокой активностью и низкой токсичностью для клеток.</p>

	<p><b>Синтез новых противоопухолевых веществ липидной природы, создание и исследование форм их адресной доставки в опухоли</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>Синтезированы липидные производные противоопухолевых лекарств, в том числе флуоресцентномеченые, а также адрес для липосом – липофильный конъюгат тетрасахаридного лиганда селективных; обнаружены различия в профилях связывания белков плазмы крови человека с липосомами, нагруженными пролекарствами мелфалана и метотрексата, что обуславливает различное влияние липосом на функционирование систем комплемента и каскада коагуляции; исследованы биологические эффекты липофильных аналогов колхициноидов в липосомальных формах в культурах опухолевых клеток человека; показан противоопухолевый эффект адресных липосом с липофильным производным комбретастина А-4 на модели острого Т-лимфолейкоза; исследованы локализация и механизм действия <i>in vivo</i> адресных цитотоксических липосом на модели карциномы легких Льюис.</p>
	<p><b>Синтез новых флуоресцентных зондов; изучение с их помощью строения и функций мембран и закономерностей переноса энергии возбуждения; изучение апоптотических процессов в клетках</b></p>	<p>The Hormel Institute, Austin, MN USA) Харьковский ун-т (Украина); Кардиоцентр РАМН</p>	<p>Синтезирован ряд флуоресцентных липидных зондов, производных фосфо- и сфинголипидов, с которыми выполнен ряд биофизических работ. Проведено всестороннее изучение вновь открытого церамид-1-фосфат-переносящего белка, широко распространенного в клетках тканей млекопитающих и опосредующего ряд важных функций, в том числе синтез эйкозаноидов. Изучен механизм стимулирования активности гликолипид-переносящего белка GLTP фосфолипидами; исследованы функции аналогичного белка HET-C2. Предложена кинетическая модель, описывающая поведение флуоресцентного зонда в сыворотке, содержащей фосфолипазу А2.</p>
	<p><b>Гликоландшафт эукариотической клетки</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>Разработана методология (общий подход) получения синтетических гликолипидов с заданными свойствами. Получены активированные производные фосфатидилэтаноламина (ФЭ), где остаток ФА присоединен к коровому участку, к которому присоединены также три антенны необходимой длины, на конце каждой из которых расположен остаток активированного эфира карбоновой кислоты. Путем присоединения к нему трех остатков гликана (по каждой из антенн) получены трехвалентные гликолипиды с заранее заданным расстоянием между лигандами. Были получены также трехвалентные пептиды. Исследовано расположение в клеточной мембране галектинов прото- (галектин-1), химерного (-3) и тандемного типов (-4, -8, -9) и выяснили, что углеводсвязывающий профиль этих белков в составе клетки намного уже, чем в бесклеточных тест-системах. Более того, аффинность галектинов к гликанам зависела от типа клеток, на которые они были нагружены. Полученные данные позволили нам предположить, что галектины в составе клетки маскированы <i>cis</i>-гликанами. Синтезированы аффинные сорбенты, где в качестве биоспецифического лиганда выступает высокомолекулярная или среднего молекулярного веса гиалуроновая кислота, или олигосахариды – фрагменты гиалуроновой кислоты, включая минимальный, дисахаридный фрагмент. С помощью этих сорбентов из суммарных иммуноглобулинов человека были выделены и охарактеризованы по специфичности антитела (сумма IgG+IgM).</p>

			Разработанный ранее гликоаррэй в виде чипа 2.5x7.5 см с иммобилизованными на нем 400 лигандами гликановой природы (все гликаны в виде аминоспейсерированных производных) был адаптирован для иммобилизации гликопептидов, пептидов и белков. В частности, были иммобилизованы иммуноглобулины и белки, являющиеся известными онкомаркерами, а именно карциноэмбриональный антиген и альфа-фетопротеин.
	<b>Исследование роли NOD1, NOD2 и YB-1 белков в формировании рецепторного комплекса мурамилпептидов.</b>	ИБХ РАН	В настоящем проекте предлагается исследовать способность к формированию комплексов между мурамилпептидами, человеческими рекомбинантными фактором транскрипции YB-1 и рецепторами (или их фрагментами) NOD1 и 2. Для выполнения данной задачи на этапе 2013 г. были синтезированы аналоги глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП), представляющих собой лиганды для NOD2- рецептора и обладающих разной биологической активностью: МДП, ГМДП, непирогенный ГМДП-К, биологически неактивный ГМДП-LL, ГМДП-Lys. Также были синтезированы пептид RN, несущий «образ» ГМДП, и его биотинилированный аналог. Получены в рекомбинантной форме фактор транскрипции YB-1 и фрагменты рецептора NOD2: домен CARD1 (а.к. 1-127), нуклеотидсвязывающий домен NBD (а.к. 224-377) и обогащённый лейцинами домен LRR (а.к. 744-1040).
<b>57. Структура и функции биомолекул и надмолекулярных комплексов, протеомика, биокатализ</b>	<b>Структурно-функциональное изучение пептидов семейства KND (фрагмента лизин-специфичной деметилазы 3В человека)</b>	ИБХ РАН	В целях изучения взаимосвязи между структурой и функцией пептидов семейства KND (фрагментов лизин-специфичной деметилазы 3В человека проведен синтез нескольких аналогов KND, отличающихся от него размером цепи и природой аминокислотных остатков. Начато исследование биологических свойств этих пептидов.
	<b>Идентификация и характеристика выделенных из растений новых биорегуляторов пептидной природы, обладающих цитотоксической активностью на различных клеточных линиях рака человека</b>	ИБХ РАН	На основании полученных данных получена смесь пептидов из смеси растений - девясила высокого, хвоща полевого, чистотела большого, зверобоя и гриба чаги. Начаты исследования цитотоксической активности полученного препарата на стандартных клеточных линиях рака человека.
	<b>Исследование действия иммуносупрессирующих пептидов на модели индуцированной</b>	ИБХ РАН	Были отобраны сток аутбредных мышей (CFW), наиболее подходящий для моделирования химически индуцированного системного аутоиммунного заболевания и подобран эффективный режим иммунокоррекции циклоспорином А, который планируется использовать в качестве препарата сравнения при дальнейших исследованиях потенциальных иммуносупрессоров на данной модели.

	<p><b>системной аутоиммунной патологии у мышей</b></p>		
	<p><b>Рекомбинантные белки для медицины и биотехнологии: структура, функция, рациональный дизайн</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>Разработана система бесклеточной продукции никотинового ацетилхолинового рецептора человека в функционально-активной форме. Получены и исследованы мутантные варианты бактериальной РНКазы биназы с заменой по второму фосфат-связывающему центру. Проведены исследования физико-химических свойств и биологической активности рекомбинантного трансформирующего фактора роста человека TGFβ1. Сконструированы, получены и исследованы новые варианты терапевтических гумани-зированных антител против интерферона-гамма с улучшенной аффинностью и нейтрализующей активностью. Получены флуоресцентные варианты цитокин-связывающих белков на основе домена фибронектина. Проведен анализ структуры альбумина с помощью метода АНИС и определены подходы к конструированию модифицированных форм белка с повышенной компактностью упаковки молекулы. Проведено исследование влияния внеклеточного кальция на способность активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток периферической крови продуцировать специфические цитокины, характерные для Т-х1, Т-х2 и Т-х17 клеток. Получен рекомбинантный флуоресцентный лиганд эфрина А1 и проведено исследование его активности. Разработан метод флуоресцентной детекции и направленного поиска лигандов калиевого канала Kv1.1 на основе гибридных рекомбинантных биомолекул.</p>
	<p><b>Системный анализ пептидогенеза растений</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>В работе проведено системное исследование пептидогенеза в гаметофорах, протонеме и протопластах мха <i>P. patens</i>. В представленном исследовании мы впервые детально охарактеризовали пептидные пулы на разных стадиях развития. На основе высокоточного масс-спектрометрического анализа впервые были продемонстрированы существенные различия между пептидомами протопластов, протонемы и гаметофоров, представленных несколькими тысячами уникальных пептидов. В условиях стресса, в протопластах мха отмечены существенные изменения пептидома и транскриптома в сравнении с протонемой и гаметофорами.</p>
	<p><b>Трехпетельные белки и их фрагменты в исследованиях Суспензительных рецепторов и связанных с ними болезней.</b></p>	<p>ИБХ</p>	<p>На основании компьютерного моделирования комплексов водорастворимой формы трехпетельного белка (Ws-Lynx1) из мозга с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAХР) в них выбраны и проведены мутации и с помощью радиолигандного анализа и электрофизиологии идентифицированы остатки Ws-Lynx1, существенные для взаимодействия с мышечными и/или нейрональными nAХР.</p>

	<p><b>Низкомолекулярные природные компоненты – от алкалоидов до пептидов, как база для создания высокоэффективных инструментов исследования различных рецепторных мишеней.</b></p>	<p><b>ИБХ</b></p>	<p>Исследованы 14 низкомолекулярных соединений, выделенных их различных видов тропических и дальневосточных губок и асцидий, на способность взаимодействовать с некоторыми представителями Gys-петельных рецепторов (мышечным и альфа7 нейрональным подтипами никотиновых холинорецепторов, глициновым рецептором), а также ацетилхолин-связывающим белком, радио-лигандным и электрофизиологическим методами. Показано, что целый ряд соединений обладает микромолярным сродством как к мышечному, так и нейрональному альфа7 подтипам холинорецептора, но не к глициновому рецептору. Одно из соединений - сокотрастерол сульфат, потенцирующее связывание радиолганда с холино-рецепторами, претендует на роль положительного аллостерического модулятора.</p>
	<p><b>Пептидомика и транскриптомика ядов змей для идентификации новых пептидов и белков</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>В результате выполнения данного этапа работы с использованием крупномасштабного секвенирования нуклеиновых кислот получен транс-криптом ядовитой железы гадюки <i>Azemiopsfeae</i> и проведен его биоинформационный анализ. На основании проведенного анализа идентифицированы новые пептиды и белки и выведены их аминокислотные последовательности. В результате анализа выявлено более 7 тысяч аминокислотных последовательностей, из которых более 2 тысяч обнаружили сходство с известными белками. В частности, следует отметить наличие новых аминокислотных последовательностей трех-петельных токсинов, отличающихся от уже известных.</p>
	<p><b>Исследование природных антимикробных пептидов – молекулярных факторов врожденного иммунитета</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>С целью получения аналога ареницина, обладающего пониженной гемолитической активностью, нами была создана генно-инженерная конструкция для экспрессии модифицированного пептида, содержащего замену Ala6Ser, в клетках <i>E.coli</i>. Плазмидная конструкция была получена путем направленного внесения мутации в структуру созданной нами ранее плазмиды pET-His8-TrxL-Ar1, содержащей последовательность, кодирующую природный ареницин-1 в составе гибридного белка с тиоредоксином и N-концевым октагистидиновым участком. Мутагенез осуществляли путем полного копирования исходной плазмиды методом инвертированной ПЦР с введением мутаций с помощью мутагенизирующего праймера и последующей рециркуляризацией ампликона. В результате мутации исходный остаток аланина заменялся на серин. Конструкция предназначена для экспрессии под контролем промотора T7lac в штамме <i>E. coli</i>BL21(DE3) и аналогичных штаммах, содержащих ген РНК-полимеразы фага T7. Индуктором может служить лактоза или ее синтетические аналоги, например, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Открытая рамка считывания завершается стоп-кодоном TAA, а транскрибируемая область ограничивается терминатором транскрипции фага T7. Плазмида несет ген β-лактамазы, придающий клетке устойчивость к ампициллину (до 500 мкг/мл) и дополнительный ген <i>lac</i>-репрессора.</p> <p>2. С использованием разработанных экспериментальных тест-систем для характеристики мембранной активности антимикробных пептидов на основе бислойных липидных мембран, моделирующих мембраны грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также клеток млекопитающих, проведено исследование модифицированных аналогов</p>

			<p>антимикробного пептида ареницина из морского кольчатого червя <i>Arenicola marina</i> с целью поиска новых антибиотиков направленного действия. Проведено сравнительное исследование влияния двух аналогов ареницина-1 (A-11 и A-12) с точечными заменами отдельных аминокислот в определенных положениях полипептидной цепи на ионную проводимость бислойных липидных мембран (БЛМ), моделирующих по своему составу цитоплазматические мембраны грамотрицательных и грамположительных бактерий (БЛМ-G<sup>-</sup> и БЛМ-G<sup>+</sup>), а также плазматическую мембрану клеток млекопитающих (БЛМ-ПМ). Установлено, что оба аналога являются мембраноактивными и так же, как и сам ареницин, индуцируют интенсивные флуктуации мембранного тока на всех типах изученных мембран. В то же время, между этими аналогами имеются существенные различия в отношении мембранолитической активности - все изученные мембраны были более устойчивы к действию аналога A-11 по сравнению с аналогом A12. Кроме того, в случае БЛМ-G<sup>+</sup> флуктуации появляются практически сразу (в течении 2-3 мин) после добавления обоих аналогов, тогда как на БЛМ-G<sup>-</sup> они возникают только после 8-10 мин в случае аналога A-12 и после 20 мин в случае аналога A-11. Следует отметить, что подобная зависимость наблюдалась и для самого ареницина. Это позволяет предположить, что БЛМ-G<sup>+</sup>, моделирующая плазматическую мембрану грамположительных бактерий, вообще является более чувствительной к действию ареницинов. Таким образом, из полученных нами данных видно, что, несмотря на внешнюю похожесть в действии аналогов A-11 и A-12 на проводимость БЛМ, эти аналоги ведут себя совершенно по-разному в отношении проявлений мембранолитической активности. Аналог A-12, вероятно, действует на мембрану аналогично природному ареницину-1. После его добавления к мембране он сначала вызывает одиночные флуктуации мембранного тока, количество и интенсивность которых с течением времени нарастает, что и приводит к разрушению мембраны. В то же время, точечная замена аминокислотных остатков в аналоге A-11, по-видимому, является более значимой для реализации механизма порообразования, так как несмотря на то, что аналог A-11 меняет проводимость мембраны, индуцируя флуктуации тока, свидетельствующие о формировании пор, их образование не вызывает разрушения мембраны.</p> <p>3. Разработан способ получения рекомбинантного аналога изоформы Lc-LTP3 липид-транспортного белка чечевицы <b>Lens culinaris</b>. Было установлено, что Lc-LTP2 является перекрёстно-реагирующим пищевым аллергеном. Для изучения роли других изоформ липид-транспортного белка чечевицы в развитии пищевой аллергии нами была создана система для гетерологической экспрессии Lc-LTP3 в клетках <i>E. coli</i> и разработан эффективный способ выделения и очистки рекомбинантного белка. Эффективность расщепления гибридного белка оценивали методом SDS-электрофореза в ПААГ. Очистку целевого белка от нерасщепленного гибридного белка и белка-партнера проводили с помощью металлохелатной хроматографии в денатурирующих условиях на колонке с Ni<sup>2+</sup>-сефарозой. Финальную стадию очистки рекомбинантного Lc-LTP3 проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Гомогенность полученного препарата и идентичность рекомбинантного аналога природному белку подтверждали с помощью SDS-электрофореза в ПААГ, МАЛДИ-времяпролётной масс-спектрометрии, автоматического секвенирования по методу Эдмана и КД-спектроскопии. Выход рекомбинантного Lc-LTP3 составил не менее 5 мг/л культуры в пересчете на чистый</p>
--	--	--	---

			<p>белок.</p> <p>4. Разработан способ получения рекомбинантного белка, включающего аминокислотную последовательность лантибиотика из терморезистентных бактерий <i>Bacillus licheniformis</i>. На основе плазмиды pET32a(+) (Novagen) и штамма <i>E. coli</i> BL-21 Star (DE3) была создана конструкция, позволяющая экспрессировать предшественник лантибиотика Lch<math>\alpha</math> из терморезистентных бактерий <i>Bacillus licheniformis</i> в составе гибридного белка под контролем промотора бактериофага T7. Плазида pET32-LchA1 кодирует гибридный белок, состоящий из N-концевого белка-носителя тиоредоксина <i>E. coli</i> (Trx), гистидинового гексамера и предшественника лантибиотика Lch<math>\alpha</math> (LchA1). Между последовательностью тиоредоксина и гистидиновым гексамером расположен сайт расщепления TEV-протеазой, наличие которого позволяет удалить из состава гибридного белка белок-носитель посредством специфической ферментативной реакции. В структуре LchA1 между последовательностями сигнального пептида и лантибиотика Lch<math>\alpha</math> расположен сайт расщепления фактором Xa, наличие которого позволяет получить целевой продукт. Штамм-продуцент <i>E. coli</i> BL-21 Star (DE3)/pET32-LchA1 был получен методом химической трансформации по стандартной методике. Выход гибридного белка His6-LchA1 составил не менее 10 мг/л культуры в пересчете на индивидуальный белок. Масс-спектрометрический анализ фракций элюата подтвердил присутствие пептида, имеющего аминокислотную последовательность лантибиотика Lch<math>\alpha</math> из терморезистентных бактерий <i>Bacillus licheniformis</i>.</p>
	<b>Роль инсулин рецептор-подобного рецептора в регуляции функции вставочных клеток почки</b>	ИБХ РАН	<p>Показано, что мыши, нокаутные по гену IRR, при бикарбонатной нагрузке имеют пониженную экспрессию обменника пендрина и повышенную экспрессию аквапорина 2 в клетках коры почки по сравнению с мышами дикого типа. Используя littermate мышей дикого типа и нокаутов по рецептору IRR, мы получили транскриптомы из срезов почек. В нокаутных мышцах в сравнении с мышами дикого типа было обнаружено пониженное содержание мРНК как минимум 30 белков и также повышенное количество мРНК приблизительно 60 белков. Экспрессия гена инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF-2) в почках нокаутных мышей оказалась в 5 раз выше.</p> <p>Проведен анализ линии мышей с направленной инактивацией гена <i>insrg</i>, кодирующего рецептор IRR, и выявлены их фенотипические отличия, обусловленные нарушением регуляции кислотно-щелочного равновесия. Нами было показано, что нокаутные мыши по гену <i>insrr</i> имеют повышенную на 20% массу тела в сравнении с мышами дикого типа при одинаковом потреблении пищи в обеих группах. Масса почек также на 15% выше у нокаутных мышей. Как следствие этого уровень клубочковой фильтрации в почках мышей нокаутного типа выше, чем у дикого типа. У нокаутных мышей мы обнаружили гораздо более высокий пульс, чем у мышей дикого типа.</p> <p>Частично картированы участки и отдельные аминокислотные остатки, отвечающие за pH чувствительность рецептора IRR, используя различные химерные белки IRR и IR.</p>
	<b>Изучение белок-белковых взаимодействий, важных для роста</b>	ИБХ РАН	<p>1. Показано, что взаимодействие сурвивин-рап важно для хемиорезистентности глиобластомы. Нарушение комплекса сурвивин-Рап при помощи низкомолекулярного вещества LLP-3 препятствует выживанию глиобластомных клеток, предлагая новый терапевтический подход.</p> <p>2. Реконструирован интерактом лизилоксидазы с учетом взаимодействия фактора репрессии</p>

	<p><b>и метастазирования опухолевых клеток</b></p>		<p>р66-β с каталитическим доменом лизилоксидазы человека.</p> <p>3. Изучены особенности постнатальной регуляции экспрессии генов семейства X,K-ATФаз и локализации соответствующих белков по мере кератинизации клеток эпидермиса. Показано, что Na,K-ATФаза имеет латероапикальное распределение в эпидермисе.</p> <p>4. На основе контроля авидности антител разработаны способы диагностики вторичных иммунодефицитов и оценки подходов к использованию фотоиммуномодуляторов.</p>
	<p><b>Структурно-функциональные исследования протеиназ, осуществляющих процессинг белков и регуляцию клеточных функций. Протеиназы социально опасных заболеваний.</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p><b><u>АТР-зависимый протеолиз</u></b></p> <p>При изучении АТР-зависимой Lon-протеазы (Lon) – ключевого фермента внутриклеточной селективной деградации белков в <i>Escherichia coli</i> получены рекомбинантные формы <i>EcLon</i>, несущие гексагистидиновые фрагменты в С-концевой части белка, – Lon-H6, Lon-S679A-H6, Lon-R192A-H6 и Lon(107-784)-H6 (d106-Lon-H6). Показано, что протеазная функция Lon не зависит ни от присутствия N-концевого домена, ни от мутации консервативного остатка аргинина в «длинной» спирали coiled-coil(CC)-участка, которая приводит к самодеградации Lon-R192A-H6. Построена трехмерная модель димера фрагмента Lon(1-245), выявлены сайты – потенциальные участники межсубъединичных взаимодействий в олигомере фермента, с целью их последующего направленного мутагенеза. <b><u>Протеиназы экстремофилов</u></b></p> <p><b>а) <u>психрофильная протеиназа из микроорганизма <i>Serratia Proteamaculans</i></u></b></p> <p>Ограниченным протеолизом получена укороченная форма психрофильной олигопептидазы В из <i>Serratia proteamaculans</i> (PSP). Определены N-концевая последовательность продукта химотрипсинализа PSP и сайты протеолиза. Укороченный вариант препарата PSP эффективно гидролизует высокомолекулярный субстрат азоказеин. Полноразмерный фермент подобной активностью не обладает. Разработана модель природного комплекса PSP с шаперонином из <i>S. proteamaculans</i>, обнаруженным ранее при выделении PSP. Выделен прочный комплекс (1:1)шаперонина GroELE. <i>coli</i> с активным рекомбинантным ферментом PSP и исследованы его физико-химические свойства.</p> <p><b>б) <u>термостабильные протеиназы из кишечника личинок жука-кожееда <i>Dermestes maculatus</i></u></b>. Созданы конструкции, содержащие ген, кодирующий последовательность катепсина-L<i>Dermestes maculatus</i>. В клетках <i>Escherichia coli</i>: DE3 и Rosetta экспрессированы три варианта белка - полноразмерный кДа и два укороченных – 33 и 45 кДа. Последние выделены аффинной хроматографией на Ni-агарозе, охарактеризованы методом зимографии и по гидролизу специфического хромогенного субстрата Z-Ala-Phe-Arg-pNa.</p> <p><b><u>ВИЧ-1 протеиназа</u></b></p> <p>Методом остановленного потока проведено сравнительное исследование влияния ингибиторов протеазы ВИЧ-1 I-го и II-го поколений на элементарные стадии гидролиза ферментом дикого типа и его мультирезистентными мутантами субстратов, моделирующих сайты расщепления Gag-Pol белка между матриксным и капсидным белками и между капсидным и нуклеокапсидным белками (FRET-субстрат и Dns-субстрат, соответственно). Показано, что сайт гидролиза FRET-субстрата является предпочтительным при процессинге вирусных белков протеазой ВИЧ-1.</p>

		<p>РУДН, медицин- ский факультет (Аллилуев А.П.)</p>	<p><b><u>IgA1 протеаза из <i>Nesseriameningitides</i></u></b> Исследованы иммуногенные и протективные свойства фрагментов IgA1 протеазы полученные ограниченным протеолизом полноразмерного фермента. на мышцах линии Balb/c. После двукратной иммунизации уровень антител к этим фрагментам в крови мышей возрос в 4-6 раз по сравнению с первичной иммунизацией и составил для различных фрагментов соответственно 1:2560, 1:640 и 1:10240, что свидетельствует о формировании иммунологической памяти к IgA1 протеазе. Все образцы обладали способностью защищать иммунизированных ими мышей от заражения живой культурой менингококков серогруппы В.</p> <p><b><u>Теоретические исследования в области механизма действия протеиназ. Компонент комплемента C1q.</u></b> Разработан метод поиска неизвестного, структурно не обособленного сайта связывания низкомолекулярных ингибиторов с белками, позволивший определить структурные и кинетические параметры связывания белка C1q с лигандами, ингибирующими его взаимодействие с иммунными комплексами, которые можно использовать как лекарственные средства для терапии патологических состояний, связанных с нежелательной активацией системы комплемента: аллергических реакций, отторжения трансплантированных органов и др. Охарактеризованы остатки C1q, вовлеченные в это взаимодействие.</p>
	<p><b>Механизмы регуляции функциональной активности отдельных нейрональных кальциевых сенсоров</b></p>	<p>ФИБХ Лаборатория химии белка</p>	<p>Начато изучение влияния структуры вариабельного С-концевого сегмента НКС на индивидуальные функциональные способности этих белков. В частности получены несколько химерных форм НКС, между которыми произведен обмен последовательностями С-концевых сегментов. Начато изучение физико-химических характеристик полученных химерных форм. Показано, что введение С-концевого сегмента GCAP2 в структуру придает последнему способность активировать родопсинкиназу в отсутствие кальция, в то время как GCAP2 с интегрированным С-концевым сегментом рековерина приобретает свойства ингибитора родопсинкиназы при насыщающей концен-трации катиона. Так же, начато проведение сравнительного исследования структурных и функциональных характеристик 2-х НКС, рековерина и GCAP2, содержащих или не содержащих окислительные модификации по консервативному в пределах семейства остатку цистеина.</p>
	<p><b>Поиск новых ингибиторов герпесвирусной тимидинкиназы с помощью компьютерного моделирования.</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>Проведено тестирование антигерпетической активности ранее изученного ингибитора ТК ВПГ-1. Используя технологию полногеномного секвенирования ДНК, определена первичная структура гена тимидинкиназы ВПГ-1 в популяции эталонного штамма L2.</p>
	<p><b>Оптимизация методов синтеза биологически-активных пептидов (HLDF-6, леупролида, трипторелина)</b></p>	<p>ФИБХ РАН</p>	<p>Разработан лабораторный регламент на производство амидной формы пептида HLDF-6. Осуществлена наработка опытных образцов амидной формы пептида HLDF-6 для осуществления доклинических испытаний.</p>

	<p><b>Исследование механизма взаимодействия кальций связывающего белка акворина с его функциональным партнером – зеленым флуоресцентным белком (GFP).</b></p>	<p>ФИБХ РАН Группа биоинженерии и репортерных белков</p>	<p>Получен ряд генно-инженерных конструкций, кодирующих гибридный белок eGFP<sub>Aeq</sub>, содержащие мутации в донорном модуле(акворине). Исследование физико-химических свойств полученных мутантных белков позволили локализовать аминокислотные остатки, ответственные за Са-индуцированное взаимодействие донорного модуля с eGFP Эти результаты в совокупности с результатами по мутагенезу eGFP позволяют предположить, что высокоэффективный перенос энергии биолюминесценции в гибридном белке eGFP<sub>Aeq</sub> осуществляется посредством “слабых” взаимодействий боковых радикалов аминокислот GFP, направленных наружу в акцепторном модуле с боковыми радикалами аминокислот в модуле акворина. В результате пространственной заторможенности хромофора eGFP (акцептор) и хромофора целентаразина в акворине (донор) находятся в одной плоскости, что является оптимальным условием переноса энергии по теории Ферста. Специфическое взаимодействие перечисленных аминокислотных остатков посредством белков ингибирует перенос энергии биолюминесценции.</p> <p>Разработан универсальный метод препа-ративного выделения антител из асцитных жидкостях с помощью ионообменной жидкостной хроматографии, исключающей применение жестких денатурантов, таких кислота и роданид натрия. Выделены и разработаны антитела для четырех микотоксинов. Разработаны методы химической активации микотоксинов афлатоксина, зеаралинона, охратоксина и фуманизина на основе малеиноимидного производного, специфически взаимодействующего с нужными аминокислотами поверхности гибридного белка GFP-акворин. Для каждого производного микотоксина разработаны способы их очистки от побочных продуктов реакции.</p>
	<p><b>Изучение субстратной специфичности бактериолитических ферментов, продуцируемых бактерией <i>Lysobactersp. XL1</i>: бактериолитический фермент L5.</b></p>	<p>Филиал ИБХ РАН</p>	<p>1.Произведена наработка рекомбинантного бактериолитического фермента L5 в количестве, достаточном для проведения намеченных исследований.</p> <p>2. Показано, что достаточно широкий спектр бактериолитической активности рекомбинантного бактериолитического фермента L5 совпадает с таковым для фермента L5, выделенного из культуральной жидкости бактерии <i>Lysobactersp. XL1</i>. Показано литическое действие фермента на ряд живых клеток как грамположительных, так и некоторых грамотрицательных бактерий, а также на некоторые виды дрожжей. Фермент L5 показывает более широкий спектр литической активности при обработке автоклавированных бактериальных клеток. При использовании синтетических субстратов для мурамидаз и эндопептидаз было установлено, что фермент L5 не является мурамидазой, но проявляет эндопептидазную активность. Для изучения пептидазной специфичности фермента, основываясь на литературных данных о структуре пептидов и межпептидных мостиков пептидогликанов бактериальных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также учитывая особенности структуры пептидогликанов отдельных видов бактерий внутри этих групп, сформирован список модельных пептидов, соответствующих фрагментам пептидных мостиков пептидогликанов клеточных стенок некоторых бактерий, которые, как было установлено, лизируются внеклеточным бактериолитическим ферментом L5.</p> <p>3. За отчетный период были синтезированы следующие соединения, необходимые для синтеза пептидов: Z-L-Ala-OH, Z-D-Ala-OH, Z-Lys(Z)-OH, Tos-H-Gly-OBzl, Tos-H-L-Ala-OBzl, Tos-H-D-Ala-OBzl, Z-D-Glu(OH)-OH, получены некоторые дипептиды из намеченного списка:</p>

			L-Ala-Gly, L-Ala-D-Glu, D-Ala-D-Ala.
<b>58. Молекулярная генетика, механизмы реализации генетической информации, биоинженерия</b>	<b>Структурный и функциональный анализ геномов и применения его результатов в диагностике и терапии онкологических и инфекционных заболеваний</b>	<b>ИБХ РАН  ЛСФГЧ</b>	<p>1. Доказано, что при сохранение опухольспецифичности, наибольшей активностью обладает двойной гибридный промотор PhTert-PhSurv269.</p> <p>2. Впервые было показано, что для проявления цитотоксического эффекта суицидальных генов сила промотора не имеет решающего значения.</p> <p>3. Показано, что активность промоторных областей генов CDC6, POLD1,CKS1B, MCM2, PLK1 и PCNA человека, оказалась существенно выше в опухолевых клетках, чем в нормальных фибробластах и кератиноцитах.</p> <p>4. Найдено, что транскрипция нескольких неко-дирующих РНК в дормантном состоянии находится на чрезвычайно высоком уровне, превышающем уровень транскрипции белок-кодирующих генов.</p> <p>5. Показано, что при инфекции в макрофагах статистически достоверно повышена экспрессия генов группы BiphenylDegradation, оперона катболизма холестерина и некоторых генов, вовлеченных в установление дормантного состояния.</p> <p>6. Проведен анализ влияния метилирования CpG-богатых регуляторных участков генов <i>piwil1</i> и <i>piwil2</i> на их промоторную активность. В системе транзientной экспрессии репортерного гена показано, что метилирование CpG-островков существенно снижает их промоторную активность.</p> <p>7. Отработаны условия хроматиниммунопреципитации для получения библиотек геномных фрагментов – потенциальных мишеней белков семейства PIWIL2.</p> <p>8. Отработана методика получения представительных библиотек промоторов на основе лентивирусной системы экспрессии репортерного гена.</p>
<b>58. Молекулярная генетика, механизмы реализации генетической информации, биоинженерия</b>	<b>Исследование адаптивного иммунитета</b>	<b>ИБХ РАН</b>	<p>Оригинальная стратегия, использующая специализированные методы секвенирования нового поколения и биоинформатики, применена для реконструкции и сравнительного анализа индивидуальных репертуаров Т-клеточного рецептора у монозиготных близнецов. По результатам сравнительного анализа определен вклад генетической составляющей в формирование системы адаптивного иммунитета человека.</p> <p>Разработано web-открытое программное обеспечение, MiTCR, для интеграция и анализа массивов данных Т-клеточных рецепторов, генерируемых новыми поколениями методов секвенирования.</p>
	<b>Трансген-индуцированная модификация фенотипа растительных и животных клеток и организмов для фундаментальных исследований и</b>	<b>ФИБХ  РАН</b>	<p>Получены растения с генами антимикробных пептидов бомбинина и цекропина P1. Растения проявляли повышенную устойчивость к фитопатогенам, а также к различным видам абиотических стрессов.</p> <p>Исследованы микробиологические подходы для создания растительно-микробного комплекса с устойчивостью к стресс-факторам. Колонизированные ассоциативными бактериями растения обладали большей устойчивостью к окислительному стрессу.</p> <p>Получены трансгенные растения с геном стиль-бенсинтазы <i>vin11</i>. Показана устойчивость этих растений к ряду фитопатогенов.</p> <p>Созданы растения с модифицированным синтезом стероидов, стероидов и сесквитерпенов. Показано влияние повышенной и ингибированной экспрессии гена <i>hmg1</i> в трансгенных</p>

	<b>применения в биотехнологии</b>		<p>линиях табака на степень развития арбускулярной микоризы, содержание стероидов, морфологию и функции генеративных органов, а также устойчивость растений к засолению, параквату и ионам меди.</p> <p>Получена модифицированная форма ДНК-метилтрансферазы со специфичностью CpG. Полученный модифицированный ген перенесен в эукариотические клетки. Проводится молекулярно-биологический анализ полученных трансформантов.</p> <p>Проведено клонирование хроматинзависимой ДНК-метилтрансферазы в вектор для экспрессии в культивируемых животных клетках. Проведена трансфекция животных клеток. Отобраны устойчивые линии клеток, экспрессирующих целевой ген. Проводится молекулярно-биологический анализ полученных трансформантов.</p>
	<b>Структурная и функциональная геномика вирусов бактерий</b>	<p>ИБХ РАН, ИМБИ РАН, Институт лимнологии СО РАН, ИХБФМ СО РАН, МГУ, EFPL Lausanne, Switzerland,</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Определены последовательности геномов бактериофагов PaBG, B8 <i>Pseudomonasaeruginosa</i> и Fri1 <i>cinetobacterbaumannii</i>. Особый интерес представляет собой гигантский фаг PaBG (GenBankaccessionNC_022096.1), который не имеет существенной гомологии ни с одним из геномов фагов, представленных в GenBank .</li> <li>2. Определены квазиатомные структуры белков хвостовых шипов и аппарата инъекции ДНК ряда бактериофагов (gp5.4 фага T4, gp164 фага phiKZ, gp27 фага 297, gp53 и 54 фага AP22, хвостового шипа-деполимераза фага Fri1). Установлены полисахаридные субстраты для рецепторных деполимераз фагов <i>A. baumannii</i>Fri1 и AP22. Показано, что белки семейства PAAR образуют комплекс с тройной бета-спиральной иглой продукта гена 5 фага T4 и структурных ортологов pg5 (VgrG) в составе VI системы секреции. Pg5.4, принадлежащий к этому семейству белков формирует острие, которым бактериофаг плазматическую мембрану клеток. Методом криоэлектронной микроскопии показано, что в частице фага RB43, родственного T4, имеется неизвестный структурный ортолог pg5.4 (при том, что гена, кодирующего белок 5.4 в геноме RB43 нет).</li> <li>3. Установлено, что шаперонин бактериофага ELgp146 обладает АТФазной активностью. Изучено влияние различных факторов на АТФазную активность шаперонина</li> <li>4. Определены основные параметры ферментативной активности рекомбинантных пептидогликан-гидролаз бактериофагов PMG (<i>Pseudomonas</i>),394 (<i>Salmonella</i>) и LysK (<i>Staphylococcus</i>). Проведены исследования влияния различных блок-сополимеров и аддитивов на активность и спектр действия ферментов, опробовано их действие на клинические штаммы микроорганизмов.</li> <li>5. Разработанная система ПЦР-типирования терапевтических бактериофагов псевдомонад и стафилококков была опробована на широкой выборке препаратов, промышленно выпускаемых НПО «Микроген». Было установлено, что эмпирические критерии подбора эффективности бактериофагов, применяемые на производстве, в целом соответствуют современным молекулярно-генетическим требованиям, а скрининг коллекций для выбора ранее неизвестных бактериофагов с помощью ПЦР-системы ускоряется в несколько раз.</li> <li>6. Определены условия кристаллизации 4 белков, предназначенных для кристаллизации в условиях микрогравитации во время экспедиций МКС 35 - 37.</li> </ol>
	<b>Исследование генетической</b>	ИБХ РАН	С помощью усовершенствованной системы ДНК-диагностики определен гаплотип M2 в гене аннексина A5 человека (гаплотип M2/ANXA5), ассоциированный с тромбофилиями и

	<p><b>составляющей социально-значимых заболеваний человека с помощью оригинальных тест-систем ДНК-диагностики</b></p>		<p>невынашиванием беременности у 11 пациентов Института Ревматологии РАМН. M2-гаплотип не выявлен ни у одного пациента. Проведены исследования статуса метилирования 5'-концевой области псевдогена опухолевого супрессора <i>PTENP1</i> у 105 больных гиперплазиями и раком эндометрия. Впервые обнаружено метилирование псевдогена более, чем у 50% больных, что указывает на выявление нового потенциального генетического маркера этого заболевания.</p>
	<p><b>Изучение молекулярно-биологических механизмов и разработка методов молекулярной селекции для получения растений с/х культур, устойчивых к стрессовым факторам внешней среды и с улучшенным качеством урожая.</b></p>	<p>ФИБХ РАН Лаборатория экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон)</p>	<p>Векторные конструкции содержащие следующие кассеты экспрессии: с геном белка оболочки вируса В (CVB) хризантемы в прямой и обратной ориентации, с двойной последовательностью белка оболочки вируса В в прямой ориентации, РНКи конструкция с геном белка оболочки В вируса хризантемы (CP CVB), с геном белка оболочки вируса Шарки сливы (PPV) в прямой ориентации. Полная (1400 п.н.) и укороченная (1150 п.н.) версии промотера полигалактуроназы томата с разным набором мотивов регуляции, обеспечивающих плодоспецифичную экспрессию гетерологичных последовательностей ДНК в плодах. Пять сортов яровой пшеницы (Андрос, Лада, Норис, Таежная, Энита) и один сорт озимой пшеницы (Крошка) с высоким регенерационным потенциалом для проведения различных биотехнологических исследований.</p>
	<p><b>Изучение механизмов регуляции экспрессии оперонов рибосомных белков у бактерий в нормальных и стрессовых условиях</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>Впервые показано, что оперон <i>grlY</i>, кодирующий 5S рРНК связывающий белок L25 негативно регулируется <i>in vivo</i> на уровне транскрипции алармоном <i>ppGpp</i> и фактором <i>DksA</i>, а на уровне трансляции по механизму аутогенной репрессии. Показана консервативность контрольных механизмов у 5 семейств гамма-протеобактерий.</p>
	<p><b>Структурно-функциональные исследования специфичных для человека изоформ hRPB11bβ и hRPB11cβ субъединицы РНК-полимеразы II POLR2J (hRPB11).</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>Определён основной спектр белковых партнёров новых изоформ hRPB11bβ и hRPB11cβ субъединицы РНК-полимеразы II человека POLR2J в нервной (эмбриональный мозг) и лимфоидной (клеточная линия Jurkat) тканях. Среди белков-партнёров сходных между собой изоформ hRPB11bβ и hRPB11cβ (116 а.о.) обнаружены субъединица РНК-полимеразы I IhRPB6, новый, ранее не описанный вариант ядерной рибонук-леазы IIDROSHA, коровый компонент белкового комплекса экзонных сочленений EJC (exon-exonjunctioncomplex) Y14 (RBM8A), а также белки DCAF, EIF6 и RPS3A, вместе с DROSHA участвующие в биогенезе и регуляции функционирования siRNAs.</p>

<p><b>58.</b> <b>Молекулярные механизмы клеточной дифференцировки, иммунитета и онкогенеза.</b></p>	<p><b>Исследование механизмов опухолевой прогрессии</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>Выполнен сравнительный анализ транскриптомов первичных и метастатических очагов колоректального рака, позволивший выявить кандидатные маркеры приобретенной устойчивости опухолевых клеток к антиангиогенной терапии.</p> <p>Изучен профиль «зависимости от онкогенов» при колоректальном раке, злокачественных глиомах, саркомах мягких тканей, меланомах глаза и некоторых других опухолях; выявлены новые прогностические и предиктивные маркеры с потенциальной трансляционно-медицинской значимостью.</p> <p>Получены молекулярно-генетические обоснования для разработки новых терапевтических стратегий - эпигенетической терапии при колоректальном раке и злокачественных глиомах и прерывистой таргетной «терапии сдерживания» при мелкоклеточном раке легкого и злокачественных глиомах.</p> <p>Отработаны методические приемы выделения циркулирующей внеклеточной ДНК из плазмы крови, увеличивающие выход ДНК более чем в 100 раз по сравнению со специализированными наборами реагентов.</p> <p>Усовершенствованы методы ПЦР-анализа минорных мутаций - достигнут уровень аналитической избирательности 1 : 1 000, что позволяет напрямую применять эти техники для нужд молекулярной онкодиагностики.</p> <p>Разработана высокоэффективная технология сравнительного анализа транскриптомов опухолевых образцов из парафиновых блоков.</p>
	<p><b>Ганглиозид-опосредованные сигнальные пути в нормальных и опухолевых иммунных клетках</b></p>	<p>ИБХ</p>	<p>Для получения высокоспецифических монокло-нальных антител (мАт) с различной аффинностью нами был разработан и применен новый способ получения мАт против GD2 (анти-GD2-мАт). В качестве антигена были использованы ганглиозид-мимикрирующие пептиды, а также их модифицированные аналоги. Получена панель стабильных гибридных клонов, продуцирующих анти-GD2-мАт.</p> <p>Показано, что в плазматической мембране клеток Т-лимфомы EL-4 ганглиозид GD2 контактирует с интегрином-β и не взаимодействует с рецептором смерти CD95.</p> <p>Проведен анализ температурных зависимостей эффективности переноса энергии (E) при индуктивно-резонансном переносе энергии (пары: AV-SM/Per-PC и AV-SM/Per-GM1, донором служит антривинилмеченый (AV) зонд, а акцептором – периленоилмеченый (Per)) от концентрации ганглиозида GM1. Полученные зависимости позволили охарактеризовать локализацию ганглиозида в липосомах, сформированных из трехкомпонентной рафтообразующей смеси липидов. При переходе GM1 из неупорядоченных в жидко-упорядоченные домены ганглиозид, по-видимому, локализуется на границе раздела фаз, что приводит к появлению дополнительного перегиба кри-вых при 23°C в паре AV-SM/Per-GM1, отсутствующий в паре AV-SM/Per-PC.</p>
	<p><b>Механизмы иммуномодулирующего действия эндогенных стресс-индуцируемых протеинов и новые подходы к коррекции</b></p>	<p>ИБХ РАН</p>	<p>Установлено, что одним из механизмов секреции БТШ70 нейтрофилами человека является продукция этими клетками секреторных эндолізосом, содержащих как индуцируемую, так и конститутивную формы БТШ70. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экзцитоз БТШ70 в популяциях клеток иммунной системы является нормальным физиологическим процессом. Показано, что одним из возможных механизмов участия циркулирующих БТШ70 в регуляции воспалительных процессов является нейтрализация</p>

	<b>иммунного ответа</b>		этим протеинами внеклеточного пула АТФ. Продемонстрирован иммуностимулирующий эффект миелопептидов МП-1, МП-3 и МП-5, совместно размещенных на полимерной молекуле-носителе, выраженный в усилении секреции интерферона-гамма и экспрессии TLR-2 и TLR-4 лейкоцитами человека.
<b>59. Молекулярные механизмы клеточной дифференцировки, иммунитета и онкогенеза.</b>	<b>Исследование роли белка YB-1 в реакциях врожденного иммунитета</b>	ФИБХ	Получены поликлональные антитела к белкам семейства NLR и белку NOD2, показано образование внутриклеточного комплекса YB-1 и NOD2 .
<b>61. Биофизика, радиобиология, математические модели в биологии, биоинформатика</b>	<b>Молекулярное моделирование структуры, динамики, функции биомолекулярных систем</b>	ИБХ РАН	Методами молекулярного компьютерного моделирования проведено исследование пространственной структуры, динамики и молекулярных механизмов функционирования белков, биомембран и их комплексов - с использованием физических моделей различного уровня сложности – полноатомных, «крупнозернистых» и пр. Полученные фундаментальные результаты применяются для рационального конструирования мембранных и мембрано-активных пептидов и белков (искусственных и модифицированных пептидов, их миметиков, мутантных форм и пр.) с заданным спектром биологической активности.
	<b>Разработка новых методов исследования на основе оптической микроскопии и спектроскопии и изучение функциональных свойств новых биологически-активных соединений</b>	ИБХ РАН	<p>При изучении конъюгатов хлорина <math>e_6</math> с наночастицей бис-дикарболида кобальта установлено, что ключевым структурным элементом, определяющим их высокое накопление в раковых клетках, является аминокислотный линкер, соединяющий порфириновый хромофор с наночастицей. Показано, что в основе фотоиндуцированного цитотоксического эффекта, вызываемого такими наноконъюгатами, лежит фотоиндуцированное перекисное окисление липидов, пермеаблизация лизосом и активация протеаз в цитоплазме клеток. Установлено, что присоединение аминокислотного линкера к бактериохлорину позволяет получить фотодинамически активный конъюгат, который, обладая электронным поглощением, сдвинутым в ближнюю ИК область, приобретает способность интенсивно накапливаться в цитоплазме раковых клеток и эффективно убивать их при облучении клеток светом.</p> <p>В совместных с МНИОИ им. П.А. Герцена исследованиях обнаружено иммуномодулирующее воздействие фотодинамической терапии (ФДТ) с фотосенсибилизатором Фотосенс на клетки иммунной системы, которое выражается в активации дифференцировки моноцитов в дендритные клетки. При этом нами впервые показано, что иммуномодулирующее действие ФДТ происходит при полном отсутствии клеточной гибели.</p> <p>С использованием белковых наноконструкций, встроенных в мембрану сферопластов и несущих лиганд-связывающий сайт калиевых каналов Kv1.1 и Kv1.6, разработаны и успешно апробированы методики флуоресцентной детекции лигандов каналов Kv1.1 и Kv1.6 в ядах скорпионов. Эти методики позволяют выявлять и отслеживать лиганды на всех стадиях разделения яда вплоть до моно-компонентов. С помощью методик флуоресцентной детекции</p>

			<p>охарактеризована аффинность пептида MeuKTx-1 из яда скорпиона <i>Mesobuthuseupeus</i> по отношению к каналам Kv1.1 (<math>K_d=22\pm 3</math> нМ) и Kv1.3 (<math>K_d=180\pm 30</math> нМ). Показана принципиальная возможность регистрации образования комплексов между флуоресцентно-меченым лигандом агитоксином 2 и гибридными белками-рецепторами в составе мицелл методом флуоресцентной корреляционной микроспектроскопии одиночных молекул и их комплексов.</p> <p>Разработана и реализована модульная схема экспериментальной установки для изучения молекулярных взаимодействий и структурных перестроек в одиночных иммобилизованных супрамолекулярных комплексах и, в частности, в нуклеосомах. В основе измерений одиночных иммобилизованных комплексов с применением разработанной установки лежит метод флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения, а для анализа структурных перестроек и межмолекулярных взаимодействий используется эффект Фёрстеровского резонансного переноса энергии. Показано, что установка может быть использована для изучения стационарных состояний, а также процессов, происходящих в одиночных комплексах, с временным разрешением от 100 пс.</p>
<b>62. Биотехнология</b>	<b>Нанобиогридные материалы и инструменты для биологии и медицины</b>	ИБХ РАН,  НИЯУ МИФИ,  Москва	<p>Работа соответствует Программе фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы по п.62 «Биотехнология» в разделах «разработка биосенсоров и биочиповых технологий для медицинской диагностики, экологического мониторинга и контроля биобезопасности» и «исследование новых типов многофункциональных золотых и композитных наночастиц для их применения в биологии и медицине».</p> <p>Сделан новый шаг в развитии нового направления в создании инструментов для изучения структурно-функциональных параметров объектов на наноуровне. Основой направления является совмещение методов зондовой сканирующей микроскопии с оптической микроскопией. На настоящем этапе к этим двум методам добавлена техника механического ультра-микротомирования. Метод позволяет реконструировать трехмерную структуру объектов (без ограничения на глубину сканирования), дает нанометровое разрешение и позволяет выявлять связь между структурными особенностями локальных участков объекта и спектрально-оптическими характеристиками.</p> <p>Обнаружен эффект магнитооптической активности наночастиц благородных металлов (Au и Ag, диаметром 2-50 нм) в слабом магнитном поле (около 0,5 Т). Эффект перспективен в плане его использования в диагностике при анализе биологических жидкостей в том числе мутных. Значение сигнала магнитного кругового дихроизма (МКД) пропорционально молярному коэффициенту поглощения золотых и серебряных наночастиц. Агрегация наночастиц проявляется появлением двойной полосы в спектре МКД, что предполагается использовать для дифференциального оптического детектирования различных аналитов в мутных водных растворах.</p> <p>Обнаружен принципиально новый эффект аномального возрастания нелинейно-оптических параметров квантовых точек (КТ) при их гибридации с биологическими молекулами (эффект обнаружен на примере светочувствительного белка бактериородопсина - БР). В результате формирования гибрида БР/КТ, значение нелинейного показателя преломления увеличивается до 4000 %</p>

			Эффекты модулируются степенью комплексообразования металлических наночастиц или полу-проводниковых нанокристаллов с биологическими молекулами, определяет потенциальную возможность создания нового класса биосенсоров. Полученные результаты важны как с точки зрения фундаментальной науки, так и в плане возможных практических применений.
	<b>Разработка новых подходов в создании и криосохранении генномодифицированных животных-биомоделей в соответствии с требованиями AAALAC и ISO</b>	<b>ФИБХ РАН</b>	Исследовано влияние различных факторов (криопротекторы различной природы, различные варианты замораживания) на проведение процедуры криоконсервации ранних эмбрионов мышей, содержащихся в ПЛЖ; Определены оптимальные условия для проведения всех этапов криоконсервации ранних эмбрионов мышей.
	<b>Разработка биотехнологической платформы для эффективного синтеза 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов как предшественников биосинтеза ДНК</b>	<b>ФИБХ</b>	Отработана методика культивирования штамма-продуцента полифосфаткиназы из <i>Ps. aeruginosa</i> на основе штамма <i>E.coli</i> , позволяющая получать до 35% целевого белка от общего белка клетки. Отработана методика очистки фермента, включающая : - выделение фермента в виде телец включения, - ренатурацию фермента из телец включения, - очистку фермента в одну стадию с помощью металл-хелатной хроматографии с выходом целевого белка до 65%.
	<b>Исследование и иммобилизация пептидных лигандов и белков на биочиповой платформе для диагностики инфаркта миокарда.</b>	1) Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)» (СПбГЭТУ)  2) ИБХ РАН	1.Проведен поиск путей создания мобильного диагностического прибора для экспресс-диагностики острого инфаркта миокарда на основе технологии биосенсоров, изготовленных в формате микрофлюидных систем на одноразовых чипах. 2.Апробирована концепция микрофлюидного биочипа на основе последовательной проточной системы с полосковыми биоактивными площадками. В качестве лигандов предложены и апробированы олигопептидные аптамеры. 3.Исследованы различные топологии микрофлюидной системы и найдены пути их оптимизации. Проведено численное моделирование микрофлюидной системы, что позволяет оптимизировать топологию и конструкцию микрофлюидного биочипа. Проведены работы по численному моделированию системы с поперечным массообменом для оптимизации размеров (высоты) канала. 4.Изготовлены фрагменты микрофлюидных чипов с помощью методов лазерной абляции и исследованы основы технологий их сборки в сэндвич-структуру. 5.Проведена оптимизация системы подложка-лиганд с целью уплотнения покрытия, путем обработки поверхности стеклянной подложки. Исследованы методы химического травления и плазмо-химического травления. Найдена зависимость пористой структуры от времени травления и показаны преимущества обработки методом плазмо-химического травления. Получены условия оптимального размера пор – 0,5 мкм.

			<p>6. Исследована концепция ридера, включая его конструкцию, эргономику и элементный состав. Подобраны современные элементы отображения информации на основе КМОП матриц, миниатюрные системы обработки и передачи данных. Исследована возможность использования модульного принципа архитектуры системы с использованием готовых промышленных модулей приема/отображения/передачи данных, в том числе, бюджетный вариант мобильных телефонов. Учитывая гражданский характер данной разработки – использование технической кооперации с производителями мобильных телекоммуникационных устройств представляются оправданными.</p> <p>7. Разработаны аптамеры для связывания целевых белков: миоглобина и тропонина. В результате исследований создан макет малогабаритного носимого прибора в котором реализованы новые технические решения изготовления оптического детектирования, обработки данных, конструкции, программного обеспечения, радиосвязи.</p> <p>8. Разработан критерий диагностики ОИМ по двум маркерам: МВ-КФК и тропонину, который позволяет однозначно определять время от начала ОИМ в пределах от 2-часов до 8 суток.</p>
	<p><b>Модификация пептидов и белков терапевтического назначения.</b>  <i>Ацилирование рекомбинантных инсулинов углеводсодержащими лигандами.</i></p> <p><i>Ограниченный протеолиз рекомбинантной IgA1 протеазы из <i>N.meningitidis</i>.</i></p>	ИБХ РАН	<p>Получены новые N-ацилированные производные генно-инженерного инсулина: тризамещенный N<sup>αA1</sup>N<sup>αB1</sup>-ди [N-ацетил-D-глюкозаминил-(β 1-4)-N-ацетил-D-мурамоил]-N<sup>εB28</sup>-пальмитоил-инсулин лизпро и монозамещенные: N<sup>εB28</sup>-{β-N-стеаририлглицил-[N-ацетил-D-глюкозаминил-(β1-4)]-N-ацетил-D-мурамоиламино-капроил}-инсулин лизпро и N<sup>εB28</sup>-{N<sup>α</sup>-пальмитоил-N<sup>ε</sup>-[N-ацетил-D-глюкозаминил-(β 1-4)-N-ацетил-D-мурамоил]-L-лизилглицил}-инсулин лизпро. Установлена высокая гипогликемическая активность полученных соединений и повышенная устойчивость к протеолизу в сравнении с исходным гормоном.</p> <p>Исследованы условия ферментативного гидролиза IgA1 протеазы, катализируемого трипсином и химотрипсином, иммобилизованными на макро-пористом стекле. Химотриптические гидролизаты фракционированы и использованы для изучения иммуногенной и протективной активности в отношении менингококков серогруппы В на лабораторных животных. Показана принципиальная возможность использования укороченных аналогов IgA1 протеазы для защиты от менингококковой инфекции. Рассчитана информационная структура IgA1 протеазы, получены данные для планирования фрагментации молекулы фермента.</p>
	<p><b>Получение и исследование новых полимерных материалов для биосепарации и биоанализа, иммобилизации клеток и молекул (ферментов, пептидов, биолигандов, НК и др.) и разработка новых методов и систем на основе предложенных материалов</b></p>	<p>ИБХ РАН, лаборатория «Полимеры для биологии» (Зубов В.П.) МИТХТ, ММА им. Сеченова, медицинский факультет РУДН,</p>	<p>Разработаны эффективные способы активирования поверхностей носителей различной природы (стеклянные капилляры, синтетические мембраны) с целью локализации процесса формирования биосовместимых полимерных нано-толщинных покрытий на поверхности указанных носителей.</p> <p>Разработана методика формирования слоя термочувствительного полимера поли-N-винилкапролактама на поверхности частиц сополимера акролеина со стиролом в условиях низкотемпературной радикальной полимеризации.</p> <p>Исследована цитотоксичность ап-конвертирующих нанофосфоров и способов их модификации в экспериментах <i>in vitro</i> на клеточных культурах кератиноцитов и фибробластов.</p> <p>Исследованы иммуногенные и протективные свойства фрагментов IgA1 протеазы из <i>Nisseria meningitidis</i>, полученные ограниченным протеолизом полноразмерного фермента химотрип-</p>

		<p>ЦКБ РАН, Учреждение Российской академии наук Центр "Биоинженерия" РАН, ИВС РАН, Центр биоматериалов в Ун-та г. Льеж., Бельгия, РХТУ им. Д.И. Менделеева, ВНИИМиВ г. Покров,</p>	<p>сином. Все образцы обладали способностью защищать иммунизированных ими мышей от заражения живой культурой менингококков серогруппы В. Разработан способ получения наночастиц типа «ядро-оболочка» на основе нетоксичных и биodeградируемых полимеров. На основе этих наночастиц получена аллерговакцина, включающая Т- и В-эпитопы рекомбинантных белков-аллергенов клещей домашней пыли. Оптимизированы методики получения биосовместимых пленочных материалов на основе природных полисахаридов, альгината натрия, хитозана и их комбинаций. Отработаны методики получения физических гидрогелей, предназначенных для включения различных биологически активных соединений. Получены биodeградируемые микроносители на основе различных полилактоидов (полимолочной кислоты и сополимеров молочной и гликолевых кислот), с модифицированной поверхностью, протестирован рост на них линий мышечных фибробластов (L929). Получены микро- и нановолокна на основе смеси хитозана и ПВС различного состава для их дальнейшего тестирования в модели in vitro. Получены новые микро-и наноконтейнеры на основе поливинилпирролидона, модифицированного аминокислотами. Показана принципиальная возможность включения в них модельных ДНК.</p>
	<p><b>Разработка методических подходов для доклинических исследований новых биотехнологических лекарственных средств</b></p>	<p>ФИБХ РАН</p>	<p>Проведены доклинические исследования рекомбинантного полипептида РТ1 как потенциального анальгетика для использования в медицинской практике для купирования острой и лечения хронической нейропатической боли различной этиологии.</p>
<p><b>62. Биотехнология</b></p>	<p><b>ПЭМ и АСМ исследования нанобиоструктур.</b></p>	<p>ИБХ</p>	<p>Была продемонстрирована эффективность бактериального биолюминесцентного сенсора для определения токсичности нанотрубок из углерода и нитрида бора. Для этого были синтезированы нанотрубки, проведены эксперименты по определению токсичности нанотрубок с различными характеристиками. Обнаружено, что токсикологическое действие таких нанотрубок определяется в основном их геометрическими параметрами. В результате их взаимодействия с клетками бактериального люминесцентного сенсора происходит их механическое разрушение. 2. Методом атомно-силовой микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии была показана возможность и эффективность пришивки апконверсионных наночастиц к мини антителам scFv4D5 с помощью высокоспецифичного линкера барстар:барназа (Bs:Bn). Такая система специфически связывается с молекулами, выделяемыми клетками SK-BR-3 рака молочной железы, позволяя проводить оптическое детектирование таких клеток. 3. Создан задел в области создания композитных материалов на основе биомакромолекул и</p>

			нано-трубок из углерода и нитрида бора, а также слоистых графеноподобных наноматериалов различного состава.
	<b>Исследование структурно-функциональных особенностей фаговых/бактериальных ферментов и регуляторных элементов генома прокариот, перспективных для разработки биоинженерных и медицинских технологий</b>	ФИБХ РАН	С целью идентификация бактериофагов, перспективных для создания на их основе средств терапии и медицинских материалов, получены экспрессионные генно-инженерные конструкции, содержащие ген L-аланоил-D-глутаматпептидазы бактериофага T5, разработана схема получения и выделения C <sup>13</sup> -N <sup>15</sup> – меченого фермента в количестве, достаточном для исследования структуры белка в растворе методом ЯМР. При изучении функциональной и сравнительной транскрип-томики внутриклеточных бактериальных патогенов исследован характер изменений функции-ональной активности кластеризованных промоторов в плазмиде, супрессирующей фитопатогенность <i>Erwinia carotovora</i> , при делетировании и/или комбинировании их отдельных элементов и конструировании химерных промоторных структур.
	<b>Разработка систем синтеза рекомбинантных белков на основе растительных экспрессионных платформ (биофарминг)</b>	Филиал ИБХ РАН	В ходе выполнения проекта были выбраны наиболее оптимальные для экспрессии рекомбинантных протеинов виды растений - продуцентов рекомбинантных протеинов - ряска малая и табак. Показана необходимость использования сигналов внутриклеточной компарментализации целевого белка и использования энхансированных промоторов для максимизации выхода целевых протеинов. На основе полученных результатов были сконструированы экспрессионные кассеты и трансформационные вектора для экспрессии в растениях табака и ряски малой различных антигенных детерминант вирусов гриппа птиц и свиней, а также вируса бешенства, с оптимизированным для экспрессии в растениях кодонным составом.
	<b>Модификация состава древесины и фенотипа растений осины путем суперэкспрессии гена ксилотриоксиоксигеназы <i>sr-Xeg</i> и ингибирования экспрессии гена кумарат-КоА-лигазы</b>	ФИБХ РАН	Выполнены работы по этапу «Клонирование векторных конструкций и генетическая трансформация растений осины», получены следующие результаты: - Разработаны схемы клонирования бинарного вектора, несущего экспрессионную кассету с фрагментами гена 4CL, проведено молекулярное клонирование и сконструирована плазида pBI4CL. Размер бинарного вектора, несущего данную конструкцию составил 13670 п.о. - Разработаны схемы клонирования экспрессионной кассеты с геном ксилотриоксиоксигеназы, проведено молекулярное клонирование и сконструирована плазида pBI-Xeg. Размер бинарного вектора, несущего данную конструкцию составил 13691 п.о. Функциональность созданных векторов подтверждена путем проведения агробактериальных трансформаций растений осины.

<p><b>62.</b> <b>Биотехнология</b></p>	<p><b>Разработка технологии очистки окружающей среды от устойчивых пестицидов с помощью природных возобновляемых фотодеструкторов - гуминовых веществ</b></p>	<p>ФИБХ РАН</p>	<p>Впервые ВЭЖХ последнего поколения на колонке с обращённой фазой в ступенчатом и линейном градиентах метанола с детекцией спектров поглощения и флуоресценции в режиме реального времени была использована для анализа гуминовых кислот (ГК), экстрагированных различными методами. Полученные данные экспериментально доказали, что гидрофобность ГК существенно возрастает по мере их экстракции из почвы, во многом определяя их физико-химические свойства.</p>
--	---	-----------------	---

## VI. Индикатор эффективности реализации Программы

Таблица 2

Индикатор	Единица измерения	2013 г.	
		План	Фактическое исполнение
Количества публикаций в ведущих российских и международных журналах по результатам исследований, полученных в процессе реализации Программы	единиц	300	324
Количества публикаций в мировых научных журналах, индексируемых в базе данных «Сеть науки» (WEB of Science).	единиц	250	268

**VII. Исследования, проводимые в 2013 г в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы**

**Таблица 3.**

Отделение РАН	Номер и наименование направления научных исследований Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы	Количество тем фундаментальных исследований		Разделы финансирования					
				Проекты в рамках фундаментальных Программ Президиума РАН		Проекты в рамках фундаментальных Программ отделений РАН нет		Проекты в рамках базового финансирования	
		Общее количество	Законченные	Общее количество	Законченные	Общее количество	Законченные	Общее количество	Законченные
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
Биологических наук	50. Биология развития и эволюция живых систем	1	-	1	-	-	-	1	-
	56. Физиология и биохимия растений, фотосинтез, взаимодействие растений с другими организмами	1	-	-	-	-	-	1	-
	57. Структура и функции биомолекул и надмолекулярных комплексов	35	1	28	11	-	-	35	1
	58. Молекулярная генетика, механизмы реализации генетической информации, биоинженерия	8	-	4	-	-	-	8	-
	59. Молекулярные	7	-	7	3	-	-	7	-

	<b>механизмы клеточной дифференцировки, иммунитета и онкогенеза</b>								
	<b>61. Биофизика, радиобиология, математические модели в биологии, биоинформатика</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>-</b>
	<b>62. Биотехнология</b>	<b>16</b>	<b>-</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>16</b>	<b>-</b>

**VIII. Исследования, проводимые в 2013 г по научным направлениям Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы за счет внебюджетных источников**

**Таблица 4.**

Отделе- ние РАН	Номер и наименование направления научных исследований Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы	Количество тем фундаментальных исследований		Внебюджетные источники									
				Гранты РФФИ и РГНФ		Зарубежные гранты		Государственны е Контраты		Контракты с российскими заказчиками ?		Международные проекты и соглашения с зарубежными партнерами	
				Общее количество	Законченн ые	Общее коли- чество	Законч ен-ные	Общее коли- чество	Закон- ченные	Общее количе ст-во	Закон- ченны е	Общее количе ст-во	Закон- чен- ные
		70	1	115	33	3	3	36	21	23	11	5	4
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
	<b>50. Биология развития и эволюция живых систем</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

<b>Биологические Науки</b>	56. Физиология и биохимия растений, фотосинтез, взаимодействие растений с другими организмами	1	-	3	1	-	-	1	-	1	-	-	-
	57. Структура и функции биомолекул и надмолекулярных комплексов, протеомика, биокатализ	35	1	71	21	-	-	19	10	8	4	3	3
	58. Молек. генетика, механизмы реализации генетической информации, биоинженерия	8	-	19	4	-	-	2	2	2	1	-	-
	59. Мол-е механизмы клеточной дифференцировки, иммунитета и онкогенеза	7	-	4	3	2	2	4	4	1	1	-	-
	61. Биофизика, радиобиология, математические модели в биологии, биоинформатика	2	-	2	1	-	-	5	1	1	-	-	-
	62. Биотехнология	16	-	10	1	1	1	7	5	10	5	2	1

## **IX. Сведения о результатах, достигнутых за отчетный период по темам в рамках фундаментальных научных исследований, предусмотренных Планом Института к выполнению в 2013 г. (по направлениям)**

### **Биология развития и эволюция живых систем (50)**

#### **Новые белки - регуляторы раннего развития головного мозга позвоночных.**

##### ***Лаборатория молекулярных основ эмбриогенеза***

(1) На модели эмбрионов шпорцевой лягушки изучалась функция белка *Noggi4* в регуляции активности канонического и неканонического Wnt-сигнальных каскадов. Впервые установлено, что данный белок обладает способностью связывать секретируемые факторы *Wnt8* (канонический каскад) и *Wnt11* (неканонический каскад). При этом было показано, что связывание *Noggi4* с *Wnt8* приводит к ингибированию канонического каскада, а связывание с *Wnt11* - к активации неканонического каскада.

(2). Впервые установлено, что секретируемые белки семейства *Ag1* присутствуют только у низших позвоночных (рыбы, амфибии), но отсутствуют у высших (рептилии, птицы, млекопитающие). При этом, на модели головастика шпорцевой лягушки нами было показано, что гены *Ag1* активируются в клетках регенерационной бластемы при регенерации хвоста и задней конечности. Учитывая эти данные, а также литературные данные других авторов об участии гомологов *Ag1* – белков *Ag2* – в регуляции регенерации конечностей у тритона, была выдвинута гипотеза о том, что утрата высшими позвоночными способности к регенерации больших придатков тела могла быть связана с потерей их предками генов семейства *Ag1*.

(3). С помощью технологии высокопроизводительного секвенирования был начат поиск генов, регулируемых цитоскелетным белком *Zyxin* в процессе развития ЦНС.

### **Физиология и биохимия растений, фотосинтез, взаимодействие растений с другими организмами (56)**

#### **Изучение молекулярных механизмов взаимодействия в системе фитопатоген - растение-хозяин**

##### ***Группа Молекулярная диагностика***

Для иммунологической детекции фрагментов белка 1a ВЖС в растительной клетке, была получена панель моноклональных антител (МА) к рекомбинантному фрагменту 1528-1590 ака белка 1a ВЖС, слитому с GFP (зеленый флуоресцирующий белок). В результате слияния миеломных клеток линии Sp2/0 со спленоцитами иммунной мыши было получено 5 стабильных гибридомных линий, продуцирующих МА к слитному экспрессионному белку 6-GFP. Было проведено перекрестное тестирование пяти полученных МА с другим слитным белком, содержащим искомым фрагмент – 6-DHFR (слитный белок фрагмента репликазы ВЖС и белка дегидрофолатредуктазы). С помощью иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга было показано, что МА, продуцируемые линиями 4A2, 4A1 и 4C2 реагируют с обоими белками, что позволяет сделать вывод об их специфической реакции с фрагментом репликазы 1a ВЖС. Еще два фрагмента CR репликазы 1a, которые, как предсказано, формируют отдельные гидрофобные домены – CR-1 (ако 1114-1301) и CR-2 (ако 1301-1498), были клонированы в бинарном векторе в виде слитных с GFP белков. Мы обнаружили, что CR-2 глобулы ко-локализуются с актиновыми филаментами.

Для получения рекомбинантных пептидов предварительно проводили сборку искусственных генов, кодирующих пептиды *EcAMP1* и *EcAMP2*. Сборку осуществляли из двух олигонуклеотидов, последовательности которых были получены методом обратной транскрипции из аминокислотной последовательности пептидов с использованием таблицы кодонов для *E. coli*. На 5'-конце синтетического гена вставили последовательность, кодирующую сайт расщепления энтерокиназой - DDDDK. Анализ проб показал, что слитый белок TRX-*EcAMP1* нарабатывается в достаточном количестве после 4 часов индукции и находится в растворимой форме. После выделения гибридного белка TRX-*EcAMP1* методом металл-аффинной хроматографии его дальнейшая очистка осуществлялась путем обессоливания обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

Были идентифицированы следующие компоненты: *EcAMP1* (средняя молекулярная масса 4275 Да), тиоредоксин *E.coli* (молекулярная масса около 16,8 кДа), а также оставшийся негидролизированный фьюжн-белок (молекулярная масса около 21 кДа). Эффективность гидролиза составила около 42% от теоретически возможного. Чистота рекомбинантного пептида *EcAMP1* составляет более 96%.

Были установлены гомологи пептидов *EcAMP1* и *EcAMP2* у других растений семейства злаковых: гомологи *EcAMP2* были обнаружены у растений риса (*Oryza sativa*), кукурузы (*Zea mays*), сорго (*Sorghum bicolour*), гомологи *EcAMP1* также и проса (*Panicum virgatum*). Найденные последовательности ДНК и мРНК, кодируют полипротеин протяженностью 150-500 аминокислотных остатков.

# Структура и функции биомолекул и надмолекулярных комплексов, протеомика, биокатализ (57)

## Иммуноактивные синтетические фрагменты белков для разработки новых подходов к иммунопрофилактике, лечению и диагностике нейродегенеративных и онкологических заболеваний

### Лаборатория синтетических вакцин

Для разработки новых подходов к созданию препаратов для иммунотерапии болезни Альцгеймера синтезированы ранее не описанные фрагменты белков - потенциальных мишеней нейротоксического воздействия бета-амилоидного пептида. Выбор участков для синтеза осуществлен на основе анализа данных рентгено-структурного исследования рецептора конечных продуктов гликозилирования (RAGE) и рецептора нейтрофинов (p75). Выявлены как неструктурированные экспонированные петли белка, являющиеся наиболее вероятными В-эпитопами, так и участки, соответствующие внутренним петлям. Для выбора фрагментов прионного белка проведен анализ данных литературы о его потенциальных сайтах связывания с бета-амилоидом. Также выбраны новые функционально значимые фрагменты опухолеассоциированных белков сурвивина и нуклеофозмина. Осуществлен твердофазный синтез пептидов, соответствующих выбранным фрагментам.

Были выявлены фрагменты рецептора конечных продуктов гликозилирования (RAGE) и рецептора нейтрофинов (p75), а также ранее не описанные фрагменты прионного белка, иммунизация которыми мышей с экспериментально индуцированной формой болезни Альцгеймера (бульбэктомированные мыши) приводила к сохранению пространственной памяти животных (совместно с ИБК РАН).

Изучен механизм иммунопротективного действия ранее выявленного пептидного фрагмента прионного белка 95-123 и антител к нему в экспериментальной модели болезни Альцгеймера. Показано, что иммунизация этим фрагментом мышей с нейродегенерацией альцгеймеровского типа, вызванной удалением обонятельных луковиц, предотвращает нарушение пространственной памяти животных, снижает уровень мозгового бета-амилоида. Иммунизация предохраняет гипокампальные и кортикальные нейроны от дегенерации, вызванной операцией бульбэктомии. Таким же протективным действием обладают аффинно очищенные противопептидные антитела, введение животным антител приводит как к восстановлению пространственной памяти животных так и к сохранению синаптической плотности нейронов мозга. Полученные данные свидетельствуют о том, что иммунизация синтетическим фрагментом прионного белка может стать основой для разработки новых средств терапии и профилактики болезни Альцгеймера.

С помощью синтетических пептидов получены новые аффинно очищенные антитела к опухолеассоциированным белкам сурвивину и нуклеофозмину. С помощью противопептидных антител к нуклеофозмину получены данные о принципиальных различиях в содержании, мономер-олигомерном статусе и структурных формах этого белка в нейронах и клетках глии, охарактеризовано состояние нуклеофозмина в культурах клеток глиомы и нейробластомы человека (совместно с Лабораторией структурной биохимии). Получены новые аффинно очищенные противопептидные антитела, способные распознавать аминокислотную замену Е/К в 129 положении сурвивина. С помощью этих антител показано, что клетки HeLa (карцинома шейки матки) и MCF-7 (рак молочной железы) экспрессируют сурвивин с аминокислотным остатком Е в положении 129.

## Структура, динамика, механизмы действия и биологическая функция белков и пептидов

### Отдел структурной биологии

#### Лаборатория биомолекулярной ЯМР спектроскопии

На примере FGFR3 из семейства рецепторов факторов роста фибробластов проведен анализ белок-белок и белок-липид взаимодействий для ТМ домена, получена пространственная структура ТМ домена и исследованы конформационные изменения при его ассоциации. Предложен механизм активации FGFR3 в норме и при патологиях. Одно из перспективных направлений в структурной биологии являются исследования мембранных белков – изучение механизма функциональной димеризации битопных мембранных белков и конструирование активных веществ, для адекватной терапии социально-значимых заболеваний. Получены <sup>15</sup>N и <sup>13</sup>C меченые препараты, соответствующие ТМ домену белка рецепторной тирозинкиназы FGFR3. Установлена пространственная структура гомодимера FGFR3tm - симметричный димер с левой сверхспирализацией параллельных α-спиралей. Димер стабилизирован контактами Ван-дер-Ваальса между остатками Leu и Ile и стэкинг-взаимодействием Phe и Tyr. α-Спирали взаимодействуют по “семичленному” мотиву YA<sup>374</sup>X<sub>2</sub>L<sup>377</sup>X<sub>2</sub>G<sup>380</sup>X<sub>2</sub>FF<sup>384</sup>X<sub>2</sub>IL<sup>388</sup>X<sub>2</sub>A<sup>391</sup>X<sub>2</sub>TL<sup>395</sup>, на котором расположены 3 известные патогенные мутации Tyr373Cys (проонкоген), Gly380Arg (ахондроплазия), Ala391Glu (синдром Крузона, проонкоген). Альтернативный тандемный GG4-мотив A<sup>574</sup>X<sub>3</sub>S<sup>378</sup>X<sub>3</sub>G<sup>380</sup>, предсказанный молекулярным моделированием, предполагает правозакрученную ассоциацию ТМ спиралей FGFR3, аналогичную РТК ErbB в активном

состоянии рецептора. Сопоставления с литературными данными показали, что, активация РТК семейства FGFR может происходить по вращательно-сцепленному механизму марионетки (“string-puppet mechanism”).

Разработана методика измерения энергии димеризации мембранных белков в мицеллярных средах посредством гетероядерной ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Взаимодействия между трансмембранными (ТМ)  $\alpha$ -спиралями представляют большой интерес для современной структурной биологии, поскольку такие взаимодействия определяют третичную структуру и функциональность большинства мембранных доменов эукариот. Поэтому, в рамках Проекта в 2013 году была разработана методика для измерения свободной энергии димеризации ТМ спиралей в мицеллярных средах методами ЯМР спектроскопии высокого разрешения. Методика включает в себя протоколы измерения заселенности олигомеризационных состояний из интенсивностей кросс-пиков в двумерных спектров ЯМР, а также физическую модель, используемую для конвертации полученных заселенностей в свободную энергию ТМ спираль-спирального взаимодействия. Методика отличается широким диапазоном применимости — она может быть использована как для исследования слабо димеризующихся спиралей, так и для измерения свободной энергии димеризации и олигомеризации ТМ доменов, способных образовывать высокостабильные димеры и олигомеры высокого порядка. Разработанная методика была опробована на ТМ доменах рецепторов FGFR3 и VEGFR2.

Для структурно-динамических исследований методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии на основе методов белковой инженерии разработаны две системы экспрессии и очистки рекомбинантного  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -изотопно-меченого ТМ домена белка-предшественника бета-амилоида APP с металл-связывающим участком. Более половины мутаций белка-предшественника бета-амилоида (ПБА, APP - amyloid precursor protein), обнаруженных при наследственных формах болезни Альцгеймера, приходится на его трансмембранный домен. Патогенные мутации, как предполагают, влияют на структурно-динамические свойства трансмембранного домена APP, изменяя его конформационную стабильность и/или латеральную димеризацию. Несмотря на множество данных о патогенезе этой болезни, начальные этапы ее развития остаются неясными до настоящего времени. Для изучения молекулярных основ возникновения заболевания выбран фрагмент APP<sub>671-726</sub>, содержащий трансмембранный и металл-связывающий домены. Данный фрагмент является субстратом гамма-секретазного комплекса, аномальная активность которого приводит к образованию амилоидогенных фрагментов A $\beta$ 42. Создана высокоэффективная система бесклеточной продукции фрагмента APP<sub>671-726</sub> и усовершенствованная система его бактериального синтеза. Оба метода позволяют получать миллиграммовые количества изотопно-меченого белка для структурных исследований методом гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

Методами гетероядерной ЯМР-спектроскопии высокого разрешения проведено исследование димеризации и олигомеризации трансмембранного домена гемагглютинина вируса гриппа. Трансмембранный (ТМ) домен гемагглютинина вируса гриппа играет важную роль в процессе проникновения РНК вируса внутрь заражаемой клетки. Гемагглютинин вируса гриппа является тримерным белком, а его ТМ домен принимает участие в тримеризации. В рамках проекта было проведено исследование олигомеризации ТМ домена гемагглютинина в различных мембраноподобных средах в присутствии и в отсутствие модификаций остатков цистеина (S-алкилирование гексадецилметантиосульфатом). Был разработан протокол для высокоэффективной экспрессии и модификации цистеинов ТМ сегментов гемагглютинина. Было показано, что в органических растворителях ТМ домен имеет спиральную конформацию, как в алкилированном, так и в неалкилированном состоянии. Было обнаружено, что ТМ сегмент гемагглютинина имеет высокую склонность к олигомеризации: в различных мембраноподобных средах при высоком соотношении липид/белок исследуемый пептид присутствовал в более чем трех олигомерных формах. Модификация остатков цистеина S-гексадецилом еще более увеличивала склонность пептида к олигомеризации, вызывая укрупнение бицелл и увеличение числа олигомерных форм в мицеллах.

Методами ЯМР определена пространственная структура и охарактеризована динамика липид-транспортующего белка из семян чечевицы (Lc-LTP2). Исследована структура комплекса Lc-LTP2 с DMPG и лизо-фосфолипидом LPPG. Lc-LTP2 координирует фосфолипиды и лизо-фосфолипиды в разной ориентации. Методами ЯМР-спектроскопии определены пространственная структура и динамика липид-транспортующего белка (LTP) из семян чечевицы *Lens culinaris* (Lc-LTP2). Он состоит из четырех  $\alpha$ -спиралей (Н1-Н4) и длинного С-концевого участка без вторичной структуры. Гидрофобных боковые цепи формируют большую внутреннюю полость (туннель) - сайт связывания липидов. Arg45, Pro79, и Tyr80 локализованы вблизи входа в полость и, вероятно, контактируют с полярной головкой липида. Эта полость ( $\sim 600 \pm 100 \text{ \AA}^3$ ) значительно больше наблюдаемых ранее в апо-формах белков семейства LTP (от 80 до 300  $\text{ \AA}^3$ ), однако меньше чем в известных комплексах LTP/липид (от 800 до 1400  $\text{ \AA}^3$ ). Титрование Lc-LTP2 фосфолипидом DMPG выявило формирование нестабильного комплекса, сопровождаемое увеличением полости. Исследована пространственная структура и внутримолекулярная динамика стабильного комплекса Lc-LTP2/LPPG (лизо-фосфолипид). Структуры апо-формы белка и комплекса Lc-LTP2/LPPG имеют небольшие отличия и увеличенную до  $1000 \pm 100 \text{ \AA}^3$  полость. Ориентации лизолипида LPPG и фосфолипида DMPG во внутренней полости Lc-LTP2 не совпадают, т.е. белки семейства LTP способны по-разному координировать фосфолипиды и лизо-фосфолипиды, что, по-видимому, связано с их функцией.

Установлена структурная формула люциферина из сибирских олигохет *Fridericia heliota*. Биолуминесцентная АТФ-зависимая система олигохет включает 5 компонент: низкомолекулярное соединение

люциферин, фермент люциферазу, магний, АТФ и атмосферный кислород. С помощью 0.005 мг природного люциферина по данным ЯМР и масс-спектрометрии были предложены 4 варианта структурной формулы люциферина, синтез всех вариантов позволил определить искомую структурную формулу по совпадению спектров и биолуминесценции в тестах *in vitro*.

### Исследование природных антимикробных пептидов – молекулярных факторов врожденного иммунитета Научно-образовательный центр (НОЦ) ИБХ РАН

С целью получения аналога ареницина, обладающего пониженной гемолитической активностью, нами была создана генно-инженерная конструкция для экспрессии модифицированного пептида, содержащего замену Ala6Ser, в клетках *E.coli*. При поиске аналогов АМП с низкой гемолитической активностью общепринятым подходом является снижение общей гидрофобности молекулы путем введения гидрофильных аминокислотных остатков. Замена аланина на серин позволяет повысить гидрофильность молекулы без значительных изменений в размере функциональной группы. Плазмидная конструкция была получена путем направленного внесения мутации в структуру созданной нами ранее плазмиды рЕТ-His8-TrxL-Ar1, содержащей последовательность, кодирующую природный ареницин-1 в составе гибридного белка с тиоредоксином и N-концевым октагистидиновым участком. Мутагенез осуществляли путем полного копирования исходной плазмиды методом инвертированной ПЦР с введением мутаций с помощью мутагенизирующего праймера и последующей рециркуляризацией ампликона. В результате мутации исходный остаток аланина заменялся на серин. Циркуляризацию амплифицированной плазмиды проводили с помощью лигазной реакции. Размер плазмиды рЕТ-His8-TrxL-Ar1(A6S) составляет 5822 п.о., размер кодируемого гибридного белка – 144 аминокислотных остатков (16,1 кДа). Конструкция предназначена для экспрессии под контролем промотора T7lac в штамме *E. coli* BL21(DE3) и аналогичных штаммах, содержащих ген РНК-полимеразы фага T7. Индуктором может служить лактоза или ее синтетические аналоги, например, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Открытая рамка считывания завершается стоп-кодоном ТАА, а транскрибируемая область ограничивается терминатором транскрипции фага T7. Плаزمида несет ген β-лактамазы, придающий клетке устойчивость к ампициллину (до 500 мкг/мл) и дополнительный ген *lac*-репрессора.

С использованием разработанных экспериментальных тест-систем для характеристики мембранной активности антимикробных пептидов на основе бислойных липидных мембран, моделирующих мембраны грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также клеток млекопитающих, проведено исследование модифицированных аналогов антимикробного пептида ареницина из морского кольчатого червя *Arenicola marina* с целью поиска новых антибиотиков направленного действия. Проведено сравнительное исследование влияния двух аналогов ареницина-1 (А-11 и А-12) с точечными заменами отдельных аминокислот в определенных положениях полипептидной цепи на ионную проводимость бислойных липидных мембран (БЛМ), моделирующих по своему составу цитоплазматические мембраны грамотрицательных и грамположительных бактерий (БЛМ-G<sup>-</sup> и БЛМ-G<sup>+</sup>), а также плазматическую мембрану клеток млекопитающих (БЛМ-ПМ). Установлено, что оба аналога являются мембраноактивными и так же, как и сам ареницин, индуцируют интенсивные флуктуации мембранного тока на всех типах изученных мембран. В то же время, между этими аналогами имеются существенные различия в отношении мембранолитической активности - все изученные мембраны были более устойчивы к действию аналога А-11 по сравнению с аналогом А12. Кроме того, в случае БЛМ-G<sup>+</sup> флуктуации появляются практически сразу (в течении 2-3 мин) после добавления обоих аналогов, тогда как на БЛМ-G<sup>-</sup> они возникают только после 8-10 мин в случае аналога А-12 и после 20 мин в случае аналога А-11. Следует отметить, что подобная зависимость наблюдалась и для самого ареницина. Это позволяет предположить, что БЛМ-G<sup>+</sup>, моделирующая плазматическую мембрану грамположительных бактерий, вообще является более чувствительной к действию ареницинов. Таким образом, из полученных нами данных видно, что, несмотря на внешнюю схожесть в действии аналогов А-11 и А-12 на проводимость БЛМ, эти аналоги ведут себя совершенно по-разному в отношении проявлений мембранолитической активности. Аналог А-12, вероятно, действует на мембрану аналогично природному ареницину-1. После его добавления к мембране он сначала вызывает одиночные флуктуации мембранного тока, количество и интенсивность которых с течением времени нарастает, что и приводит к разрушению мембраны. В то же время, точечная замена аминокислотных остатков в аналоге А-11, по-видимому, является более значимой для реализации механизма порообразования, так как несмотря на то, что аналог А-11 меняет проводимость мембраны, индуцируя флуктуации тока, свидетельствующие о формировании пор, их образование не вызывает разрушения мембраны.

Разработан способ получения рекомбинантного аналога изоформы Lc-LTP3 липид-транспортующего белка чечевицы *Lens culinaris*. Ранее в проросших семенах чечевицы *Lens culinaris* нами было обнаружено семейство из восьми изоформ липид-транспортующего белка (Lc-LTP1–8). Было установлено, что Lc-LTP2 является перекрёстно-реагирующим пищевым аллергеном, зарегистрированным нами в базе данных Международного союза иммунологических обществ (IUIS) под аббревиатурой Len с 3.0101. Для изучения роли других изоформ липид-транспортующего белка чечевицы в развитии пищевой аллергии нами была создана система для гетерологической экспрессии Lc-LTP3 в клетках *E. coli* и разработан эффективный способ выделения и очистки рекомбинантного белка. Гомогенность полученного препарата и идентичность рекомбинантного аналога природному белку подтверждали с помощью SDS-электрофореза в

ПААГ, МАЛДИ-времяпролётной масс-спектрометрии, автоматического секвенирования по методу Эдмана и КД-спектроскопии. Выход рекомбинантного Lc-LTP3 составил не менее 5 мг/л культуры в пересчете на чистый белок.

Разработан способ получения рекомбинантного белка, включающего аминокислотную последовательность лантибиотика из терморезистентных бактерий *Bacillus licheniformis*. На основе плазмиды pET32a(+) (Novagen) и штамма *E. coli* BL-21 Star (DE3) была создана конструкция, позволяющая экспрессировать предшественник лантибиотика Lch $\alpha$  из терморезистентных бактерий *Bacillus licheniformis* в составе гибридного белка под контролем промотора бактериофага T7. Плазида pET32-LchA1 кодирует гибридный белок, состоящий из N-концевого белка-носителя тиоредоксина *E. coli* (Ttx), гистидинового гексамера и предшественника лантибиотика Lch $\alpha$  (LchA1). Между последовательностью тиоредоксина и гистиридиновым гексамером расположен сайт расщепления TEV-протеазой, наличие которого позволяет удалить из состава гибридного белка белок-носитель посредством специфической ферментативной реакции. В структуре LchA1 между последовательностями сигнального пептида и лантибиотика Lch $\alpha$  расположен сайт расщепления фактором Ха, наличие которого позволяет получить целевой продукт. Выход гибридного белка Ttx-His6-LchA1 составил не менее 40 мг/л культуры в пересчете на индивидуальный белок. Выход гибридного белка His6-LchA1 составил не менее 10 мг/л культуры в пересчете на индивидуальный белок. Масс-спектрометрический анализ фракций элюата подтвердил присутствие пептида, имеющего аминокислотную последовательность лантибиотика Lch $\alpha$  из терморезистентных бактерий *Bacillus licheniformis*.

### **Структурно-функциональное изучение пептидов семейства KND (фрагмента лизин-специфичной деметилазы 3В человека)**

#### ***Лаборатория химии пептидов***

В целях изучения взаимосвязи между структурой и функцией пептидов семейства KND (фрагментов лизин-специфичной деметилазы 3В человека) проведен синтез нескольких аналогов KND, отличающихся от него размером цепи и природой аминокислотных остатков. Начато исследование биологических свойств этих пептидов для оценки фармакологического потенциала этой группы соединений, гомологичных по структуре гипотетическому белку предшественнику известного нейропептида DSIP.

### **Идентификация и характеристика выделенных из растений новых биорегуляторов пептидной природы, обладающих цитотоксической активностью на различных клеточных линиях рака человека**

#### ***Лаборатория химии пептидов***

Изучена цитостатическая активность различных пептидных экстрактов на клеточных линиях рака человека. Показано, что на трансформированных клеточных линиях A549 и H1299 рака легких человека, и линии HeLa рака шейки матки человека цитостатическая активность наблюдается у пептидов из экстрактов чая зеленого, гриба чаги и смеси растений (девясила высокого, хвоща полевого, чистотела большого и гриба чаги), а на клетках линий MCF-7 и MCF-10 РМЖ, HT1080 фибросаркомы человека – лишь у пептидов из экстрактов чистотела большого, зверобоя продырявленного и девясила высокого. На основании полученных данных получена смесь пептидов из смеси растений - девясила высокого, хвоща полевого, чистотела большого, зверобоя и гриба чаги. Начаты исследования цитотоксической активности полученного препарата на стандартных клеточных линиях рака человека.

### **Исследование роли NOD1, NOD2 и YB-1 белков в формировании рецепторного комплекса мурамилпептидов.**

#### ***Лаборатория химии пептидов***

В настоящем проекте предлагается исследовать способность к формированию комплексов между мурамилпептидами, человеческими рекомбинантными фактором транскрипции YB-1 и рецепторами (или их фрагментами) NOD1 и 2. Для выполнения данной задачи на этапе 2013 г. были синтезированы аналоги глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП), представляющих собой лиганды для NOD2-рецептора и обладающих разной биологической активностью: МДП, ГМДП, непирогенный ГМДП-К, биологически неактивный ГМДП-LL, ГМДП-Lys. Также были синтезированы пептид RN, несущий «образ» ГМДП, и его биогинилированный аналог. Получены в рекомбинантной форме фактор транскрипции YB-1 и фрагменты рецептора NOD2: домен CARD1 (а.к. 1-127), нуклеотидсвязывающий домен NBD (а.к. 224-377) и обогащенный лейцинами домен LRR (а.к. 744-1040).

### **Разработка и применение технологий флуоресцентного мечения живых систем *Лаборатория Биофотоники, группа биологии активных форм кислорода и группа синтеза природных соединений***

Впервые тестированы фототоксические эффекты флавопротеина MiniSOG на культурах клеток млекопитающих Были. Были выбраны три внутриклеточные локализации белка miniSOG – на плазматической мембране (miniSOG-mem), в матриксе митохондрий (miniSOG-mito) и в составе хроматина (H2B-miniSOG). Все эти варианты показали высокую фототоксичность (клеточную гибель) для клеток HeLa in vitro. Важно

отметить, что miniSOG в различных локализациях вызывал различные клеточные ответы. Так, облучение синим светом клеток с miniSOG-mito и H2B-miniSOG вызывало активацию каспазы-3, чего не наблюдалось в случае miniSOG-mem. H2B-miniSOG опосредовал светозависимое повреждение геномной ДНК и активацию репарационной системы клетки.

Была протестирована фототоксичность белка KillerRed при его локализации на цитоплазматической стороне мембраны лизосом. Эта локализация была достигнута за счет слияния KillerRed с белком Rab7, ассоциированного с лизосомами и поздними эндосомами. В экспериментах на клетках HeLa и REF52 была показана высокая фототоксичность KillerRed-Rab7, сопоставимая с таковой ранее охарактеризованных вариантов KillerRed, локализованных на плазматической мембране и в матриксе митохондрий. Интересно отметить, что KillerRed-Rab7 вызывал некротическую гибель клетки при относительно высоких интенсивностях облучения зеленым светом, или апоптоз при низких интенсивностях света. Таким образом, KillerRed-Rab7 может быть использован в качестве оптогенетического «переключателя», направляющего клетку по пути или некроза, или апоптоза.

*Разработка и применение новых генетически кодируемых сенсоров.*

Был создан сенсор HyPer-3 - улучшенная версия сенсора пероксида водорода HyPer с высоким динамическим диапазоном и быстрым восстановлением. Был получен биосенсор HyPer-H34Y с высоким соотношением сигнала к шуму, названный HyPer-3. Полупериод окисления HyPer-3 был в 1,4 раза быстрее, чем окисления HyPer-2. Полупериод восстановления HyPer-3 был наиболее коротким среди всех исследуемых образцов. Мы показали, что концентрации  $H_2O_2$ , инициирующие скорость реакции ( $K_{ox}$ ) с сенсором, составляющую половину от максимальной, составляют 160 нМ для HyPer, 290 нМ для HyPer-2 и 260 нМ для HyPer-3 (принимая во внимание падение концентрации  $H_2O_2$  при пересечении плазматической мембраны в 500 раз). Константы скорости реакций псевдо-первого порядка ( $K_s$ ) составили  $5 \cdot 10^5 M^{-1} \cdot сек^{-1}$  для HyPer,  $1,2 \cdot 10^5 M^{-1} \cdot сек^{-1}$  для HyPer-2 и  $2,5 \cdot 10^5 M^{-1} \cdot сек^{-1}$  для HyPer-3. Мы протестировали производительность HyPer-3 в сравнении с HyPer на модели раны в эмбрионах *Danio rerio*. мРНК, кодирующая HyPer-3, была инъецирована в эмбрионы *Danio rerio* на стадии одной клетки. За флуоресценцией сенсора наблюдали в течение 3 дней после оплодотворения. Нанесение раны животным путем ампутации кончика хвостового плавника приводило к появлению выраженного градиента  $H_2O_2$  в хвостовом отделе рыб. Важно отметить, что из-за улучшенного динамического диапазона HyPer-3 детектируемые изменения соотношения F500/F420 были сильнее, по сравнению с HyPer. Максимальное изменение соотношения пиков для HyPer составляло  $1,72 \pm 0,18$ , в то время как для HyPer-3 было детектировано увеличение соотношения пиков в  $2,53 \pm 0,39$  раза.

*Создание и использование органических красителей на основе хромофоров флуоресцентных белков.*

Получен ряд красителей – флуоресцентных аналогов хромофора GFP, с различными ауксохромными заместителями. Полученные красители – близкие аналоги хромофора GFP представляли собой твердые кристаллические соединения, стабильные в широком диапазоне температур (до 250°C). Растворы этих соединений в различных растворителях имели ярко выраженную окраску, варьирующуюся от зеленого до темно-красного цвета. В большинстве случаев растворы имели также заметную флуоресценцию.

Направленное изменение спектральных свойств производных хромофора GFP, содержащих дифторборильную группу, проводился по двум направлениям. Во-первых, нами были созданы производные, имеющие сопряженную систему, содержащую ауксохромный заместитель, лежащий во втором положении имидазольной части хромофора, аналогичные хромофору белка Kaede. Во-вторых, в ходе настоящей работы были созданы производные, имеющие циклический заместитель между позициями 1 и 2 имидазольной части хромофора. Синтез данных соединений проводился на основе неборированных аналогов хромофора GFP с циклическим заместителем, полученных ранее. Синтез борированных аналогов хромофора GFP, с различными ауксохромными заместителями, содержащих линкерные группы проводился на основе производного хромофора GFP, содержащего остаток гамма-аминоасляной кислоты. На основе полученного производного, содержащего кислотную группу также были получены производные, имеющие иные линкерные заместители – азидную и аминокислотную группы.

## **Механизмы посттрансляционных модификаций флуоресцентных белков семейства GFP**

### ***Группа химии хромопротеинов***

С использованием бактериальной системы экспрессии в бескислородных условиях были получены незрелые формы GFP-подобных белков TagBFP, TagRFP, DsRed2 и cгCP. Сразу после выделения белков (также в бескислородных условиях) следили за кинетикой созревания по изменению спектров поглощения в видимом и ближнем УФ-диапазоне. Во всех образцах наблюдалось наличие промежуточной формы с максимумом поглощения при  $\sim 400$  нм, которая превращалась в конечную зрелую форму белка. Был проведен масс-спектрометрический анализ хромофора белка TagBFP. По литературным данным в этом белке хромофор не содержит двойной связи между фенольным и имидазолиновым кольцами, но содержит ацилиминную группу. Однако, согласно полученным нами данным хромофор имеет структуру GFP-типа. Об этом же свидетельствуют и данные спектрофотометрического титрования хромофорсодержащего пептида. Для дополнительной проверки корректности проводимых масс-спектрометрических экспериментов был выделен хромофорсодержащий пептид из родственного белка - TagRFP. В тандемных масс-спектрах был идентифицирован фрагмент, содержащий GFP-хромофор с массой увеличенной на 2 Да за счет фрагментации непосредственно перед ароматической системой. Таким образом, промежуточная форма белков на самом деле может содержать не ацилимин-замещенный хромофор, а изостерическое ему соединение.

Проведена наработка флуоресцентного белка DendFP в количествах, достаточных для кристаллизации. Получены кристаллы DendFP и проведен анализ дифракционных данных, который обнаружил наличие как минимум двух кристаллических изоформ белка. Наличие изоформ не позволило получить пространственную структуру белка. Для преодоления этого препятствия получены мутантные варианты DendFP, которые по предварительным данным не должны образовывать тех же изоформ. Мутантные белки наработаны в препаративных количествах для последующей кристаллизации.

## **Исследование пространственной организации и структурно-функциональной взаимосвязи белков методами рентгеноструктурного анализа, биоинформатики, молекулярной механики/динамики**

### **Лаборатория рентгеноструктурного анализа**

В соответствии с планом методами рентгеноструктурного анализа высокого разрешения и сайт-направленного мутагенеза установлены пространственные структуры и изучена структурно-функциональная взаимосвязь серии новых флуоресцентных белков (ФБ) зеленого, желтого и красного спектральных диапазонов.

#### **1\_ Желтый PhiYFP:**

Генно-инженерный флуоресцентный вариант phiYFPv (лямбда<sub>эм</sub> = 537 нм) с улучшенным фолдингом был получен на основе спектрально-идентичного желтого флуоресцентного белка (ФБ) дикого типа phiYFP, выделенного из морской медузы *Phialidium*. PhiYFP – один из двух известных в настоящее время природных белков, проявляющих эмиссию в желто-оранжевой области спектра (535-555 нм). Кристаллическая структура phiYFPv была установлена рентгеноструктурным методом при разрешении 2.05 Å. “Желтый” хромофор исследуемого белка принимает копланарную бициклическую структуру типичную для флуорофоров с эмиссией в зеленой области спектра. Установлено, что антипараллельный пи-стэкинг ароматических колец Tyr66 хромофора и соседнего Tyr203, а также наличие гидрофобного остатка Val205 рядом с фенольным кольцом хромофора, являются основными факторами, ответственными за наблюдаемую желтую эмиссию phiYFPv при 537 нм. На основе анализа пространственной структуры сайт-направленным мутагенезом были установлены ключевые функциональные остатки в окружении хромофора. Полученные результаты по структурно-функциональной зависимости димерного phiYFPv были использованы для улучшения спектральных свойств как исследуемого phiYFPv, так и используемого в практике гомологичного мономерного биомаркера tagYFP.

#### **2\_ Зеленый laGFP и красный laRFP:**

Методом рентгеноструктурного анализа установлены пространственные структуры зеленого laGFP (лямбда<sub>возб.</sub> = 502 нм и лямбда<sub>эм.</sub> = 511 нм), а также красного флуоресцентного белка (ФБ) дикого типа - laRFP (лямбда<sub>возб.</sub> = 521 нм и лямбда<sub>эм.</sub> = 592 нм; *Branchiostoma Lanceolatum*) и его спектрально и структурно идентичного генно-инженерного варианта с улучшенным фолдингом - laRFP-del\_S83 (с делецией остатка Ser83) при разрешении 1.7, 2.3 и 1.9 Å, соответственно. **Это первые ФБ с установленной пространственной структурой из группы хордовых структурно неизученного подсемейства Bilaterian.** Они характеризуются крайне низкой аминокислотной идентичностью (~20%) с ФБ из хорошо изученного эволюционно удаленного подсемейства Cnidarian (морские кораллы, анемоны, полипы, медузы и т. д.). Основные особенности пространственной организации зеленого laGFP близки таковым других известных зеленых ФБ. Напротив, структура laRFP впервые продемонстрировала необычные структурные черты, отсутствующие у других ФБ дикого типа из Cnidarian. Первое, у красного laRFP обнаружена необычная хромофор образующая последовательность Gly58-Tyr59-Gly60. Второе, у него обнаружен остаток Gln211 (предположительно ключевой для формирования хромофора) вместо консервативного каталитического Glu211, характерного для всех известных до сих пор природных ФБ. Третье, структура хромофора характеризуется отсутствием типичной для красных белков N-ацилиминной двойной связи, а также наличием необычной ковалентной связи между атомом (Tyr59)<sup>β</sup> хромофора и гидроксильной группы ближайшего остатка Tyr62. Предполагается, что именно эта ковалентная связь в первую очередь является ответственной за наблюдаемый большой сдвиг Стокса (LSS) ~80 нм. На основе полученных структур методом сайт-направленного мутагенеза установлены ключевые аминокислотные остатки в области хромофора красного laRFP ответственные за его необычные спектральные характеристики и предложен вероятный стереохимически-обоснованный молекулярный механизм образования ковалентной связи между хромофором и Tyr62 в процессе пост-трансляционной модификации белка.

Координаты атомов пяти структур - phiYFP, laGFP, wild type laRFP, laRFP\_delS83 и laRFPdem (после длительной экспозиции под рентгеновским излучением) были депонированы в Международный банк белковых структур с кодами доступа **4HE4, 4HVF, 4JF9, 4JGE, 4JEO**, соответственно.

## **Протеомно-генетический анализ защитных пептидов беспозвоночных и растений с целью идентификации новых веществ, взаимодействующих с функционально-важными компонентами клеточной мембраны**

### **Лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов**

Целью проекта является идентификация и характеристики новых веществ, взаимодействующих с функционально-важными компонентами клеточной мембраны.

Поведено клонирование гена, кодирующего рецептор  $\text{rTRPA1}$ , в вектор  $\text{pcDNA4/TO}$ , осуществлена соответствующая трансфекция клеток  $\text{TREX/CHO}$ , методом селекции отобраны линии клеток, стабильно экспрессирующие соответствующий рецептор под контролем тетрациклин-зависимого промотора  $\text{CMV}$ , получены стабильные клеточные линии, экспрессирующие данный рецептор. С использованием метода флуоресцентной спектроскопии в комбинации с применением планшетного спектрофотометра с интегрированной автоматической системой дозирования жидкостей  $\text{NOVOstar}$  ( $\text{BMG LABTECH}$ ) проведена характеристика рецепторов  $\text{rTRPA1}$ , изучены ответы клеток на приложение соответствующих агонистов  $\text{rTRPA1}$  рецептора (коричный альдегид, аллиллизотиоцианат ( $\text{AITC}$ )), разработана тест-система, основанная на регистрации  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов клеток, индуцируемых при стимуляции агонистами рецепторов, а также в ответ на активирующие стимулы с присутствии различных биологических образцов.

С использованием разработанного метода скрининга природных объектов по отношению к рецепторам  $\text{rTRPV1}$ ,  $\text{hTRPV3}$ ,  $\text{rTRPA1}$ , стабильно экспрессированным в клетках  $\text{TREX/CHO}$ , проведено тестирование более 50 образцов экстрактов морских беспозвоночных, ядов членистоногих, а также экстракты 10 различных растений.

Экстракты, активных видов актиний были подвергнуты фракционированию, проведено тестирование отдельных фракций, определены активные молекулы:

- 4 модулятора активности рецептора  $\text{rTRPV1}$  (М.м. 6689, 6706, 4955 и 4931 Да);

- 1 ингибитор  $\text{hTRPV3}$  (М.м.6731 Да)

- 6 модуляторов активности  $\text{rTRPA1}$  (М.м. 3315, 6695, 2947,3878, 3654, 4793 Да), для двух соединений установлена полная аминокислотная последовательность.

Определение структуры активных молекул проводится методами молекулярной биологии с использованием библиотеки  $\kappa\text{ДНК}$  пептидов анемоны и данных масс-спектрометрии и N- концевой аминокислотной последовательности.

На рецепторы  $\text{rTRPV1}$ ,  $\text{hTRPV3}$  были протестированы образцы из девяти растений: высушенные побеги коровяка (*Verbascum oreophilum*), высушенные листья и плоды туты (*Morus nigra L.*), высушенные плоды бирючины (*Ligustrum vulgare L.*), высушенные незрелые плоды грецкого ореха (*Juglans regia*), высушенные корни девясила (*Inula helenium*), плоды каштана (*Castanea sativa*), высушенные цветки и плоды бузины (*Sambucus nigra*), высушенные побеги портулака (*Portulaca Oleracea L.*). Образцы были получены методом экстракции 10 %-ной уксусной кислотой из растительного материала, и дальнейшим обессоливанием на ОФ-ВЭЖХ полученных уксуснокислых экстрактов. Концентрация тестируемых образцов составляла 1 мг/мл. Ингибирующую активность на  $\text{rTRPV1}$  продемонстрировали экстракты из листьев туты, плодов бузины. Токи  $\text{hTRPV3}$  ингибировали экстракты плодов туты и цветков бузины.

Исследована активность этанольного и уксуснокислого экстрактов лаврового листа, в которых обнаружена ингибирующая активность по отношению к рецепторам  $\text{rASIC3}$ ,  $\text{rASIC1a}$ ,  $\text{rTRPV1}$ ,  $\text{rTRPA1}$ , потенцирующая активность по отношению к  $\text{hTRPV3}$ .

Совместно с ТИБОХ ДВО РАН проведены работы по выделению и характеристике индивидуальных соединений из морских губок. Охарактеризовано семейство ациклических гуанидиновых алкалоидов - пульхранин А, В и С из дальневосточной морской губки *Monanchora pulchra*. Проведено детальное изучение взаимодействия пульхранинов А, В и С с рецепторами  $\text{rTRPV1}$ ,  $\text{hTRPV3}$  и  $\text{rTRPA1}$ . Показано, что при предварительной (30 мин) инкубации с клетками все соединения ингибируют  $\text{rTRPV1}$ , и менее активны по отношению к  $\text{hTRPV3}$  и  $\text{rTRPA1}$ , при этом активность уменьшается в ряду пульхранин А > пульхранин В > пульхранин С и  $\text{rTRPV1} > \text{hTRPV3} > \text{rTRPA1}$ . Активность пульхранинов определяется длиной их гидроксильного алкенильного мотива (пульхранин А содержит гидроксильную мононенасыщенную углеводородную цепь, содержащую 13 атомов углерода (C13), пульхранин В - (C12), пульхранин С - (C11), соответственно). Получены количественные характеристики ингибирования  $\text{rTRPV1}$ ,  $\text{hTRPV3}$  и  $\text{rTRPA1}$

Проведено тестирование более 30 образцов природных ядов паукообразных и кишечнорастворимых на  $\text{rTRPV1}$ ,  $\text{hP2X3}$  и  $\text{ASICs}$  ( $\text{ASIC3}$  человека и крысы,  $\text{ASIC1a}$  и  $\text{ASIC2}$  крысы), экспрессированных в ооцитах *Xenopus laevis*. В результате тестирования в яде австралийского паука обнаружены ингибиторы  $\text{rTRPV1}$ , имеющие полиаминную природу, а также в экстракте анемоны *Heteractis crispa* выявлено семейство  $\text{APETx2}$ -подобных токсинов, проявляющие ингибирующую активность на рецепторах  $\text{hASIC3}$  и  $\text{rASIC1a}$ .

Проведена работа по выделению и изучению активных компонентов из яда актинии *Urticina grebelnyi*, для которого ранее была установлена активность по отношению к каналам  $\text{hASIC3}$ . Ранее с использованием последовательного разделения активных фракций методом ВЭЖХ был выделен пептид Ugr 9-1. Установлено, что Ugr 9-1 обладает уникальным действием - вызывает уменьшение как пикового ( $\text{IC}_{50} = 10 \pm 0.6$  мкМ), так и стационарного ( $\text{IC}_{50} = 1.44 \pm 0.19$  мкМ) компонента токов через  $\text{hASIC3}$  каналы, экспрессированные в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*.

На основании полученной частичной аминокислотной последовательности пептида Ugr 9-1 методом 3' и 5' RACE-ПЦР было проведено клонирование гена, кодирующего пептид с использованием вырожденных праймеров и установлена полная последовательность гена-предшественника, в составе которого было обнаружено три зрелые последовательности пептидов, содержащих по 29 остатков: Ugr 9-1 (М.м 3135Да), Ugr 9-2 (М.м 3087Да), Ugr 9-3 (М.м 3053Да). Ugr 9-2 и Ugr 9-3 были обнаружены в компонентном составе экстракта актинии *Urticina grebelnyi* масс-спектрометрически и выделены в чистом виде. Ugr 9-2 и Ugr 9-3 имеют высокий процент сходства с пептидом Ugr 9-1, однако не проявляют активности по отношению к каналам  $\text{hASIC3}$  каналы, экспрессированным в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*. На культуре DRG нейронов

показано, что Ugr 9-3 в концентрации 100 нМ модулирует активность ASIC токов, образованных субъективными ASIC1a,b, ASIC2a,b.

Для изучения пептидов Ugr 9-1, Ugr 9-2, Ugr 9-3 проведено клонирование генов, разработаны системы экспрессии в клетках *E.coli*, получены рекомбинантные аналоги. Проводятся работы по изучению активности рекомбинантных аналогов Ugr 9-2 и Ugr 9-3 по отношению к гомомерным каналам ASIC1a, ASIC1b и ASIC2a, экспрессированным в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*.

Методами ЯМР установлена пространственная структура пептида Ugr 9-1, представляющая собой «уплощенную»  $\beta$ -шпильку с пятью  $\beta$ -поворотами, стабилизированную 2 дисульфидными и 8 водородными связями. Структура является уникальной, ранее не описана для пептидов из морских анемонов.

Изучена анальгетическая активность пептидов Ugr 9-1, Ugr9-2 и Ugr9-3 в болевых моделях *in vivo* (тесты тепловой гиперчувствительности и кислотной стимуляции боли («уксусные корчи») в физиологически допустимых концентрациях (0,5 мг/кг). Показано, что пептиды обладают обезболивающим эффектом (максимальный эффект проявляет Ugr 9-1), который они проявляют в физиологически допустимых концентрациях, значения которых на порядок меньше, чем для обезболивающих препаратов, применяемых в медицинской практике.

Проведено изучение структурно-функциональных особенностей пептида Ugr9-1, получено 6 мутантных аналогов токсина с единичными аминокислотными заменами и проведено изучению их биологической активности. Показано, что мутант Ugr9-1-S16K в концентрации 1 мкМ ингибирует потенциал-зависимые калиевые каналы типа  $K_v1.1$ , экспрессированных в ооцитах *Xenopus laevis*, на 95%,  $K_v1.3$  – на 65%; пептид Ugr9-1-S16K/V20K в концентрации 1 мкМ ингибирует  $K_v1.3$  на 100% и на 40% в концентрации 250 нМ. Таким образом, показано, что введение мутаций приводит к появлению новой биологической активности.

Продолжено исследование яда Среднеазиатского паука *Lachesana tarabaei* с уникальным составом. В результате разделения яда с помощью эксклюзионной и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в индивидуальном виде выделены пять новых полипептидных инсектотоксинов ( $LD_{50}$  против личинок мясной мухи ~20 мг/кг), получивших название латартоксина (LtTx). Молекулярные массы выделенных веществ, по данным масс-спектрометрии, составили ~6,5–8,5 кДа. Полные аминокислотные последовательности LtTx (60–71 остатков) были установлены с помощью комбинации методов автоматического секвенирования по Эдману, масс-спектрометрии и селективного протеолиза. На основании сходства аминокислотных последовательностей LtTx объединены в два семейства, представители которых напоминают описанные ранее токсины CSTX и LSTX из яда пауков *Cupiennius salei* (Stenidae) и *Lycosa singoriensis* (Lycosidae). Три LtTx содержат восемь остатков цистеина и четыре внутримолекулярные дисульфидные связи, а два других отличаются наличием еще одного S-S-мостика. Кроме того, для трех полипептидов характерно С-концевое амидирование. Интересной особенностью новых токсинов является то, что они имеют N-концевой цистеин-богатый участок, характерный для множества нейротоксинов из ядов пауков, а также С-концевую линейную область, напоминающую цитолитические пептиды. Предполагается, что эта линейная область обеспечивает сродство полипептидов к мембранам, специфичное взаимодействие токсинов с белковыми рецепторами происходит затем вследствие латеральной диффузии. С-Концевой линейный фрагмент одного наиболее представленного токсина (LtTx-1a) был получен химическим синтезом. Показано, что этот пептид обладает мембранной и антимикробной активностью в микромолярных концентрациях.

В сотрудничестве с лабораторией генной инженерии Научно-исследовательского института физико-химической медицины Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию продолжено изучение антихламидийной активности пептидов из яда паука *Lachesana tarabaei*. С использованием различных схем заражения клеток хламидиями показано, что наиболее активный пептид, цито-инсектотоксина 1a (CIT 1a), оказывает свое антихламидийное действие на ранней стадии жизненного цикла паразита. По всей видимости, помимо прямого бактерицидного эффекта, антимикробные пептиды обладают способностью ингибировать развитие инфекции за счет предотвращения адгезии хламидий к клеточной поверхности.

В сотрудничестве с лабораторией оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул, а также группой нанобиоинженерии ранее была разработана эффективная система поиска блокаторов потенциал-чувствительных калиевых каналов человека  $Kv1.1$  и  $Kv1.3$ , которая основана на экспрессии в мембране бактерий *Escherichia coli* химерных белков KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.3 соответственно. Эти гибриды были получены путем встраивания внеклеточных петель соответствующих изоформ калиевых каналов человека в гомологичный участок бактериального канала KcsA. Показано, что гибридные каналы сохраняют способность связывать поровые блокаторы  $Kv1.1$  и  $Kv1.3$ . С применением метода конфокальной микроскопии можно проводить количественную оценку образования комплексов между флуоресцентно-мечеными блокаторами (например, хорошо исследованным агитоксином-2, AgTx2) и гибридными каналами. С помощью этой системы был проведен поиск блокаторов  $Kv1.1$  и  $Kv1.3$  в ядах пауков и скорпионов. Исследовались как цельные яды паукообразных, так и отдельные их компоненты, которые были выделены в индивидуальном виде с помощью хроматографических методов. Оказалось, что яды пауков лишены блокаторов калиевых каналов, способных вытеснять меченый AgTx2 из комплексов с гибридными KcsA-Kv1 и KcsA-Kv1.3. Напротив, в яде скорпионов *Mesobuthus eupeus* и *Orthochirus scrobiculosus* были обнаружены как уже известные лиганды, так и новые полипептидные блокаторы исследуемых калиевых каналов.

Проведено изучение представителей нового семейства защитных пептидов растений с уникальным расположением остатков цистеина в молекуле типа C1XXXC2X(n)C3XXXC4 ( $\alpha$ -харпининов), выделенных из семян культурной пшеницы Кихара (*Triticum kiharae*) и дикорастущего растения – звездчатка средняя (*Stellaria*

*media*), а также антимикробных пептидов из цветков сорного растения - одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale*).

Из семян гексаплоидной пшеницы (*T. kiharae*) были выделены два представителя семейства защитных пептидов растений -  $\alpha$ -харпининов, названных Tk-AMP-X1 и Tk-AMP-X2. Для данных пептидов были установлены их полные аминокислотные последовательности, и показано, что они обладают выраженной антифунгальной активностью *in vitro* по типу ингибирования прорастания спор против ряда грибов – специфических возбудителей болезней кукурузы (*Zea mays*) в микромолярном диапазоне концентраций (7,5-15 мкМ). Установлена полноразмерная структура гена, кодирующего данные пептиды, а также структура белка-предшественника. Для данного предшественника характерно особое последовательное расположение участков ДНК, соответствующих различным пептидам с 4-Cys мотивом, разделенных короткими линкерными последовательностями, а также наличие С-концевого продомена. В результате 3'- и 5'RACE ПЦР были определены полноразмерные структуры кДНК, соответствующие трем белкам-предшественникам, содержащим в своем составе пять, шесть или семь последовательностей 4-Cys пептидов. Полученные структуры генов не содержат интронов в кодирующих зрелые пептиды частях, их экспрессия индуцируется и регулируется грибным заражением и абиотическим стрессом (повышенная температура, солевой стресс), что предполагает их участие в индуцированном иммунитете данного растения. Кроме того, основываясь на данных сравнения N-концевого автоматического секвенирования по методу Эдмана и MALDI времяпролетной масс-спектрометрии с протранслированными аминокислотными последовательностями были идентифицированы первичные структуры еще двух полипептидов с аналогичным 4-Cys мотивом, названных Tk-AMP-X3 и Tk-AMP-G7. Для проведения серии биологических испытаний были разработаны системы получения рекомбинантных аналогов данных пептидов методом гетерологической экспрессии синтетических генов в прокариотической системе. Показано, что данные молекулы в тестах *in vitro* не обладали антимикробной (антифунгальной и антибактериальной) активностью при концентрации менее 50 мкМ, что, вероятно, может предполагать наличие у них какой-либо другой функции, отличной от антимикробной.

С использованием многоступенчатой жидкостной хроматографии из семян сорного растения - звездчатка средняя (*Stellaria media* L.) - был выделен и охарактеризован новый защитный пептид, названный Sm-AMP-X длиной 33 аминокислотных остатка, относящийся к семейству  $\alpha$ -харпининов. Установлено, что данный пептид в тестах *in vitro* подавляет рост и развитие широкого спектра грибных фитопатогенов. Экспериментально доказано участие N- и С-концевых участков данной молекулы в реализации функционального действия пептида Sm-AMP-X путем получения "укороченных" вариантов структур методом гетерологической экспрессии в прокариотической системе. Так, биологическая активность данных форм была гораздо менее выражена, чем у полноразмерной молекулы. Сравнение процентного содержания элементов вторичной структуры ( $\alpha$ -спиралей) у данных пептидов путем измерения спектров кругового дихроизма показало, что у мутантных форм преимущественно преобладает неупорядоченная структура. В результате 3'- и 5'RACE ПЦР была определена полноразмерная структура кДНК, кодирующая белок-предшественник, включающий 12 тандемных повторов последовательностей, кодирующих гомологи пептида Sm-AMP-X. Кроме того, по геномной ДНК были установлены структуры гена *sm-amp-x*, а также двух псевдогенов (*sm-amp-x-w1* и *sm-amp-x-w2*); функциональность двух последних, по всей видимости, была элиминирована в процессе эволюционного развития исследуемого растений.

Из цветков дикорастущего растения - одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale*) - был выделен и охарактеризован новый антифунгальный пептид ToAMP4, полная аминокислотная последовательность которого была определена автоматическим секвенированием по методу Эдмана. Показано, что данный пептид является основным, состоит из 41 аминокислотного остатка и содержит 3 внутримолекулярные дисульфидные связи. По характерному цистеиновому мотиву обнаруженный пептид не относится ни к одному из известных семейств защитных белков и пептидов растений, однако он высоко гомологичен ранее выделенным из цветков одуванчика двум антимикробным пептидам, ToAMP1 и ToAMP2. Для проведения серии биологических испытаний была разработана схема получения рекомбинантного аналога данной молекулы в прокариотической системе экспрессии в составе гибридного белка с тиоредоксином *Escherichia coli*. Данный аналог был полностью идентичен нативному по молекулярной массе, а также времени удерживания при хроматографическом разделении. Результаты тестирования антифунгальной активности рекомбинантного аналога ToAMP4 показали наличие у него высокой активности против широкого спектра микроорганизмов, которая реализуется различными способами в зависимости от видовой принадлежности фитопатогена.

## **Трехпетельные белки и их фрагменты в исследованиях Cys-петельных рецепторов и связанных с ними болезней.**

### **Отдел молекулярных основ нейросигнализации**

#### **Лаборатория рецепции нейропептидов**

На основании компьютерного моделирования комплексов водорастворимой формы трехпетельного белка (Ws-Lynx1) из мозга с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAHP) в них выбраны и проведены мутации и с помощью радиолигандного анализа и электрофизиологии идентифицированы остатки Ws-Lynx1, существенные для взаимодействия с мышечными и/или нейрональными nAHP.

## **Пептидомика и транскриптомика ядов змей для идентификации новых пептидов и белков**

### ***Лаборатория молекулярной токсикологии***

В результате выполнения данного этапа работы с использованием крупномасштабного сиквенирования нуклеиновых кислот получен транскриптом ядовитой железы гадюки *Azemiops feae* и проведен его биоинформационный анализ. На основании проведенного анализа идентифицированы новые пептиды и белки и выведены их аминокислотные последовательности. В результате анализа выявлено более 7 тысяч аминокислотных последовательностей, из которых более 2 тысяч обнаружили сходство с известными белками. В частности, следует отметить наличие новых аминокислотных последовательностей трех-петельных токсинов, отличающихся от уже известных.

## **Низкомолекулярные природные компоненты – от алкалоидов до пептидов, как база для создания высокоэффективных инструментов исследования различных рецепторных мишеней.**

### ***Лаборатория лиганд-рецепторных взаимодействий***

На данном этапе работы нами были исследованы 14 низкомолекулярных соединений, выделенных их различных видов тропических и дальневосточных губок и асцидий нашими коллегами из Тихоокеанского Института биоорганической химии. Структуры этих соединений весьма разнообразны - от липидо- и холестерол-подобных до сложных гетероциклических соединений. Все соединения были протестированы на способность взаимодействовать с некоторыми представителями Cys-петельных рецепторов – одним мышечным и одним нейрональным подтипом никотиновых холинорецепторов, глициновым рецептором, а также ацетилхолин-связывающим белком двумя различными способами. Радиолигандный анализ показывал способность исследуемого соединения конкурировать с радиоактивно меченым 125-изотопом йода альфа-бунгаротоксином за «классический» участок связывания агонистов/конкурентных антагонистов на рецепторе. Электрофизиологические тесты позволяли напрямую увидеть способность исследуемого вещества подавлять ток, вызванный действием агониста (ацетилхолина или никотина), через экспрессированный в клетках или ооцитах соответствующий подтип рецептора. При этом исследуемое вещество может связываться и не в «классическом» сайте связывания рецептора.

Было показано, что целый ряд соединений обладают достаточно высоким сродством к мышечным никотиновым холинорецепторам ската и мыши, а также к нейрональному альфа7 подтипу человека. Это сродство характеризуется микромолярными значениями IC50 (от 0.5 до 5.0 мкМ), полученными как в радиолигандном так и электрофизиологическом тестах. Однако это взаимодействие неспецифично по отношению к разным подтипам никотиновых рецепторов.

В то же время ни одно из исследованных соединений не взаимодействовало в концентрации 10 мкМ с глициновым рецептором, показывая, что эти соединения специфичны по отношению к разным представителям Cys-петельных рецепторов.

Одно из соединений - сокотрастерол сульфат - в отличие от всех остальных соединений воспроизводимо и более чем в два раза потенцировало связывание радиоактивного альфа-бунгаротоксина и к альфа7 нейрональному и к мышечному подтипам никотинового холинорецептора в концентрациях от 100 мкМ. Возможно, это соединение является положительным аллостерическим модулятором для некоторых подтипов никотиновых рецепторов.

## **Исследование механизма деградации антигенов ферментами, антителами и протеасомным комплексом в норме и при патологических состояниях организма. Структурно-функциональные особенности биокатализаторов**

### ***Лаборатория биокатализа***

Создан антидот против фосфорорганических отравляющих веществ пролонгированного действия на основе рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека.

Впервые определены фрагменты МВР(основного белка миелина), иммунодоминантные при развитии ЕАЕ у крыс линии DA.

## **Структурно-функциональные исследования новых белков и пептидов. Разработка на их основе новых методов диагностики и лечения социально-значимых заболеваний**

### ***Лаборатория белков гормональной регуляции***

1. Разработан план доклинических исследований ЛС на основе пептида HLDF-6 и лабораторный регламент его получения. Нарботаны образцы фармацевтической субстанции (ФС) и ЛС. Проведенное изучение хронической, субхронической токсичности, аллергенности и мутагенности ЛС показало, что изучаемый препарат не токсичен, не обладает аллергенными и мутагенными эффектами и может быть рекомендован для проведения дальнейших исследований.

2. Проведенное с помощью сравнительного электрофоретического анализа и вестерн-блот гибридизации суммарных белковых пулов структурированных оболочек глазного яблока (склера, сетчатка) изучение влияния растворов искусственной слезы, содержащей сбалансированные концентрации лактоферрина, на устойчивость

PEDF к действию протеолитических ферментов показало, что белок лактоферрин не оказывает существенного влияния на устойчивость PEDF к расщеплению собственными протеиназами организма при низких степенях близорукости.

3. Показано, что DYNLRB1 является активатором NDP-киназы А. Максимальный уровень активации NDP-киназы А в присутствии DYNLRB1 превышал контрольный в 9,4 раза. При определении зависимости ферментативной активности NDP-киназы А от концентрации DYNLRB1 было показано, что уровень активации фермента достигал полумаксимального значения при молярном соотношении белков 1:30 соответственно. Также показано, что DYNLRB1 вызывает активацию NDP-киназы В, фактора транскрипции *c-myc* онкогена, сопоставимую с уровнем активации NDP-киназы А. Уровни активации мутантов NDP-киназы А P96S (*Killer-of-Prune* мутация (*awd<sup>K-prn</sup>*) *Drosophila melanogaster*) и S120G (мутация, вызывающая развитие нейроblastомы человека) составили соответственно 50% и 25% от уровня активации белка дикого типа. DYNLRB1 также увеличивает уровень аутофосфорилирования NDP-киназы А, который определяли по включению [<sup>32</sup>P] в состав белка в реакции с [<sup>32</sup>P]АТФ. Уровень аутофосфорилирования NDP-киназы А в присутствии DYNLRB1 превышал контрольный в 5 раз.

4. В условиях развития воспалительного процесса, инициированного низкой дозой липополисахарида, в обонятельной выстилке крысы исследован уровень синтеза двух хитиназных белков млекопитающих Ymlolf и AMCse. При этом впервые обнаружен и идентифицирован новый укороченный вариант транскрипта гена ChiA (sAMCse).

Поскольку при доказанных показателях хронизации инфекционно-воспалительного процесса продемонстрировано, что новая сплайсформа гена AMCse (ChiA) ассоциирована только с острофазовой стадией воспалительного ответа организма, высказано предположение, что она может быть использована в качестве биомаркера прогнозируемости рецидивирующего течения болезни.

5. Получен рекомбинантный гапонин в количестве и с качеством, соответствующим требованиям кристаллизационного эксперимента (1 мл белка с концентрацией 10 мг/мл). С использованием автоматизированной системы кристаллизации проведен широкий скрининг первичных условий при двух температурах. Установлены условия, обеспечивающие мелкозернистые кристаллы. На основе клеточных линий Namalwa, THP-1, HeLa получены новые клеточные линии с измененными уровнями экспрессии гапонина и соответствующие контрольные линии. Показано, что в клетках, экспрессирующих киРНК к гапонину, уровень его мРНК и белка был снижен более, чем на 50%; а в клетках, сверхэкспрессирующих гапонин дикого типа или слитый с GFP гапонин, экспрессия гапонина превышает более чем в 10 раз уровень эндогенного белка. С помощью кПЦР в реальном времени с использованием панели клеточных линий с измененными уровнями гапонина исследованы профили экспрессии широкого спектра белков в нормальных условиях и в условиях окислительного и метаболического стрессов и показано, что наибольший эффект гапонин оказывает на интерферон-стимулируемые гены (IRF1, Smad7, ICAM1, c-Fos).

## **Структура и функции белков и надмолекулярных комплексов ядрышек клеток млекопитающих в норме и при патологиях**

### ***Лаборатория структурной биохимии***

С помощью полученных нами ранее противопептидных антител к белку ядрышка нуклеофозмину/B23 показано, что клетки глии и нейроны в мозге новорожденных крысят и культурах тканей принципиально различаются по содержанию и структурным формам нуклеофозмина. Впервые показано, что содержание нуклеофозмина в клетках глии несоизмеримо больше, чем в нейронах, а основной формой белка является SDS-устойчивая олигомерная форма, тогда как мономерная форма нуклеофозмина присутствует лишь в следовых количествах. Для изучения функций белка ядрышка SURF6 человека создана панель генетических конструкций для выявления белковых партнеров SURF6 *in vitro* (аффинная хроматография) и *in vivo* (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer) и оверэкспрессии SURF6 в клетках HeLa. Впервые показано, что SURF6 человека ассоциирован с многофункциональными белками нуклеофозмином и нуклеолином, основным ко-фактором РНК полимеразы I UBF, фактором процессинга рРНК EBP2, и эволюционно-консервативным белком NOP52, который необходим для поздних стадий созревания рРНК. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что SURF6 человека является многофункциональным белком, принимающим участие в регуляции транскрипции рДНК, процессинге рРНК и сборке рибосом. Установлено, что повышение содержания SURF6 в клетках HeLa не вызывает клеточной гибели, но задерживает клеточную пролиферацию в результате накопления клеток в G2 периоде клеточного цикла. Показано, что у мышей с ртуть-индуцированным аутоиммунным процессом аутоантитела к ядерным аутоантигенам способны проникать внутрь ооцитов и клеток гранулезы яичников на разных стадиях созревания фолликулов, где они ко-локализуются с белком ядрышка фибриллариним. Это сопровождается увеличением уровня сывороточных иммуноглобулинов класса IgG1 в 5 раз и класса IgE в 3 раза по сравнению с мышами из контрольной группы, инъецированных 0.9% NaCl то же время. Впервые разработаны подходы для выявления разных форм РНК в «ядрышках» зрелых (преовуляторных) ооцитов млекопитающих с помощью флуоресцентных красителей акридинового оранжевого (выявляет одноцепочечную РНК) и пиронина Y (выявляет двухцепочечную РНК). Установлено, что одно- и двухцепочечные РНК являются биохимическими компонентами «ядрышек» ооцитов. Впервые разработан универсальный способ выявления внутриклеточных белков в разных типах клеток млекопитающих с помощью флуоресцеин-5-изотиоционата, позволяющий не только локализовать, но и производить сравнительный количественный анализ содержания белкового компонента. Проведен комплексный анализ фенотипа и активности ядрышек в клетках HeLa в условиях окислительного стресса, индуцированного сублетальными

дозами H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Разными методами выявлено изменение функциональной активности ядрышка, включающее подавление транскрипции рДНК, уменьшение содержания РНК в ядрышках, изменения в локализации РНК-связывающих белков фибрилларина и нуклеофозмина. Динамические свойства фибрилларина и нуклеофозмина *in vivo* в условиях окислительного стресса изучены методом FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) в сочетании с EGFP-маркированием белков и конфокальной лазерной микроскопией. В совокупности полученные результаты позволили заключить, что FRAP - наиболее чувствительный метод для выявления реакции ядрышковых белков на стрессовые воздействия, а фибрилларин является ранним сенсором окислительного стресса в клетках HeLa.

## **Рекомбинантные белки для медицины и биотехнологии: структура, функция, рациональный дизайн** **Отдел биоинженерии**

*Получение и исследование интегральных мембранных белков.*

Проведено клонирование гена бактериородопсина *Exiguobacterium sibiricum* (ESR), разработаны система его функциональной продукции в мембране клеток *Escherichia coli* и бесклеточная система экспрессии в присутствии различных мембраномоделирующих сред. Проведено изучение фотоцикла ESR и его мутантных вариантов. Установлено, что донором протонов для основания Шиффа в молекуле ESR является остаток лизина Lys 96, а протон-акцепторный участок включает сопряженные остатки His 57 и Asp 85. Методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 2.3 Å расшифрована пространственная структура ESR – первая в мире пространственная структура ретиналь-содержащего белка зубактерий, не содержащего дополнительного хромофора. Обнаружено нарушение  $\alpha$ -спиральной структуры в сегменте F, включающее  $\zeta_{10}$  и  $\pi$ -спиральные элементы. Эта особенность предположительно является характерной для протеородопсинов, что позволяет использовать полученную структуру в качестве модели для изучения других белков семейства. Работа проводится совместно с Лабораторией биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ, Кафедрой биофизики Биологического факультета МГУ, Отделом физиологии и биофизики Университета Калифорнии, Ирвайн и Институтом структурной биологии, Гренобль.

*Исследование физико-химических свойств и биологической активности трансформирующего фактора роста TGF- $\beta$ .*

Проведены исследования физико-химических свойств и биологической активности рекомбинантного трансформирующего фактора роста человека TGF $\beta$ 1. Рекомбинантный TGF $\beta$ 1 был получен в мономерной форме путем замены аминокислотного остатка цистеина 77 на серин (C77S). Такой мутантный ген был экспрессирован в штамме *E. coli* B121(DE3). С помощью иммуоферментного анализа показано, что мономерная форма TGF- $\beta$ 1 димеризуется на рецепторе при высоких концентрациях и так же эффективно связывается с рецептором II типа TBRII, как и коммерческий препарат димера TGF- $\beta$ 1 человека. Показано, что мономерная форма TGF- $\beta$ 1/C77S в 100 раз менее эффективно ингибирует рост **эпителиальных клеток** линии **Mv1Lu** и **клеток мышинных лимфобластов HT-2**.

*Разработка бесклеточной системы продукции нейрорецепторов человека в функционально активной форме.*

Созданы генетические конструкции для продукции водорастворимого внеклеточного домена  $\alpha 7$  субъединицы никотинового ацетилхолинового рецептора человека ( $\alpha 7$ WS) и этого же домена с первой трансмембранной спиралью ( $\alpha 7$ WSM1) в бесклеточной белоксинтезирующей системе в виде осадка реакционной смеси. Впервые разработаны системы бесклеточной продукции  $\alpha 7$ WS и  $\alpha 7$ WSM1 в виде осадка трансляционной смеси (ТС) с выходом  $\sim 2$  мг/мл ТС. Разработан протокол солубилизации и очистки  $\alpha 7$ WSM1 из осадка ТС с помощью различных детергентов. Наибольшей стабильностью обладал препарат  $\alpha 7$ WSM1 в мицеллах LMPG. Методами КД- и ЯМР-спектроскопии показано наличие близкой к природной вторичной структуры  $\alpha 7$ WSM1 в окружении LMPG. Показано наличие функциональной активности домена в окружении мицелл LMPG. Разработан протокол ренатурации  $\alpha 7$ WS из осадка реакционной смеси, способного специфически взаимодействовать с  $\alpha$ -бунгаротоксином. Разработан протокол получения комплексов липид-белковых нанодисков с  $\alpha 7$ WSM1, обладающих высокой стабильностью и способностью специфически взаимодействовать с  $\alpha$ -бунгаротоксином. Проведено сравнение активности препаратов домена, полученных разными способами. Показано, что оптимальной средой для стабилизации функционально-активной конформации внеклеточного домена  $\alpha 7$  субъединицы рецептора являются липид-белковые нанодиски на основе POPC.

*Получение новых вариантов ФНО-связывающих белков и их гибридов с флуоресцентными белками.*

Сконструирована новая библиотека ДНК, кодирующая рекомбинантный ген 10 домена фибронектина человека (FN10) с заменами в петлевых участках BC и FG на статистический набор аминокислот и с петлей DE дикого типа. Полученный набор генов объединен с геном RepA и экспрессирован в бесклеточной системе. Методом CIS-дисплея отобраны новые варианты ФНО-связывающих белков. Исследована и оптимизирована их экспрессия, белки выделены в препаративных количествах. Сконструированы и получены гибриды FN10 и ФНО с флуоресцентным белком Cherry. Проведятся исследования цитокин-связывающих и физико-химических свойств полученных белков.

*Получение и исследование лиганда эфрина рецепторов ephrin A1.*

Проведено клонирование в плазмиде pET23d гена гибридного белка эфринA1-mKate2, представляющего собой лиганд-связывающий домен лиганда эфриновых рецепторов эфрина A1, слитого на N-конце с красным флуоресцентным белком mKate2. Подобраны условия суперэкспрессии гибрида в *E. coli*, разработаны способы его очистки и ренатурации лиганда в составе гибридной молекулы. Активность флуоресцентного белка

подтверждена методами лазерной сканирующей кофокальной микроскопии в режиме реального времени и проточной цитометрии. Показано, что белок эфрина1-mKate2 связывается и активирует рецептор EphA2 на клеточной линии HEK293(EphA2-CFP), экспрессирующей эфриновый рецептор EphA2 в слитном виде с циановым флуоресцирующим белком. Полученные данные свидетельствуют, что использование эфрина1-mKate2 упрощает анализ активности эфринового рецептора и поиск модуляторов его активности флуоресцентными методами.

*Поиск и исследование новых лигандов калиевых каналов семейства Kv1.*

Разработан метод флуоресцентной детекции лигандов к поровой части канала Kv1.1 на основе использования бактериальной системы экспрессии гибридного канала KcsA-Kv1.1. Проведена оптимизация экспрессии гибридного белка KcsA-Kv1.1 в составе мембраны E.coli и определены значения констант диссоциации ( $K_d$ ) известных лигандов канала Kv1.1 (AgTx2, KTX, OSK1, TEA), которые хорошо согласуются с литературными данными. Проведено фракционирование ядов скорпионов *Orthochirus scrobiculosus*, *Heterometrus laoticus* и *Mesobuthus eupeus* с целью поиска новых лигандов Kv1.1. С помощью разработанного метода изучена селективность и аффинность связывания нового высокоактивного блокатора Kv1.3 - хетлаксина, обнаруженного ранее в яде *Heterometrus laoticus*, с гибридными белками KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.3. В яде *Mesobuthus eupeus* найдено 7 новых пептидных лигандов, специфичных к каналам Kv1.1 и Kv1.3, проведено выделение индивидуальных лигандов и определена их первичная структура.

### **Разработка фундаментальных принципов конструирования мультифункциональных соединений направленного действия для диагностики и терапии социально значимых заболеваний** **Лаборатория молекулярной иммунологии**

Сконструированы и охарактеризованы бифункциональные соединения для специфического поражения опухолевых клеток, состоящие из нацеливающего компонента и цитотоксического белка. Сконструировано и охарактеризовано новое, полностью генетически кодируемое, бифункциональное соединение для избирательного поражения опухолевых клеток под действием света, состоящее из нацеливающего компонента и фотцитотоксического белка. В качестве нацеливающего компонента применено мини-антитело 4D5scFv, специфичное к гистохимическому маркеру HER2-neu. В качестве цитотоксического компонента использован высокотоксичный флавопротеин miniSOG (mini Singlet Oxygen Generator), который является производным LOV-домена фототропина-2 *Arabidopsis thaliana* и способен в присутствии кофактора FMN при облучении генерировать синглетный кислород с квантовым выходом  $\Phi^{\text{miniSOG}} = 0.47$  [Shu et al., 2011]. Показано, что сконструированный, полностью генетически кодируемый, иммунофотосенсибилизатор 4D5scFv-miniSOG специфически связывается с клетками аденокарциномы молочной железы SKBR3, гиперэкспрессирующими гистомаркер HER2-neu. По данным поверхностного плазмонного резонанса константа диссоциации полученного иммунофототоксина с рецептором HER2/neu составила  $10 \pm 2$  нМ, что хорошо согласуется с данными для свободного мини-антитела 4D5scFv ( $9 \pm 2$  нМ). Показано, что иммунофотосенсибилизатор 4D5scFv-miniSOG оказывает на клетки SKBR3 цитотоксическое действие ( $IC_{50} = 160$  нМ) при облучении синим светом при интенсивности облучения  $55 \text{ мВ/см}^2$ , но не при обычном дневном освещении ( $\sim 0.2 \text{ мВт/см}^2$ ). Максимальный цитотоксический эффект иммунофотосенсибилизатора 4D5scFv-miniSOG (21 % выживших клеток) наблюдали при концентрации 500 нМ. При воздействии на клетки CHO, не несущие гистомаркера HER2-neu, в темноте или при облучении белым светом цитотоксического эффекта не наблюдали при максимальной концентрации иммунофотосенсибилизатора 4D5scFv-miniSOG. Было показано, что действие иммунофотосенсибилизатора 4D5scFv-miniSOG значительно усиливается при его сочетанном применении с противоопухолевым препаратом Taxol и недавно открытым белком JO-1, улучшающим проникновение антител к опухоли [Beyer et al., 2011]. Добавление препарата Taxol в концентрации 1  $\mu\text{M}$  привело к 100% клеточной гибели клеток SKBR3 при обработке иммунотоксином 4D5scFv-miniSOG, а добавление белка JO-1 в концентрации 5 мкг/мл снизило значение  $IC_{50}$  для иммунотоксина 4D5scFv-miniSOG с 160 до 5 нМ.

Сконструированный в настоящей работе иммунофототоксин 4D5-scFv-miniSOG обладает высокоспецифичной фотоиндуцированной цитотоксичностью в отношении HER2/neu-положительных клеток аденокарциномы молочной железы человека SKBR3 ( $IC_{50}$  160 нМ), в 10 раз превышающей цитотоксичность химических конъюгатов порфиринов с мини-антителами anti-HER2/neu-scFv. Таким образом, продемонстрирована принципиальная возможность создания полностью генетически кодируемых иммунофототоксинов, превосходящих по цитотоксическим свойствам химические конъюгаты фотосенсибилизаторов с антителами.

Продолжена разработка технологии получения мультифункциональных надмолекулярных комплексов на основе нано- и микро- суперструктур путем самосборки функциональных модулей различной природы с помощью различных молекулярных адаптеров, базирующихся на белок-белковых взаимодействиях (барназа-барстар; стрептавидин-конъюгат биотина с антителами; антитело-антиген; белок А - иммуноглобулин). Путем самосборки полистирольных микро- и наночастиц двух типов с помощью молекулярных адаптеров получены бифункциональные, одновременно магнитные и флуоресцентные, коллоидные микро- и наноконструкции. Проведено детальное исследование их устойчивости в широком диапазоне условий: pH, температура, ионная сила, присутствие хаотропных агентов, ультразвуковое воздействие. Впервые продемонстрировано, что системы нековалентной самосборки, в которых участвуют гибридные функциональные элементы – конъюгаты

коллоидных частиц с белками, необычно стабильны и выдерживают экстремальные для молекул белков денатурирующие условия. Сравнение системы барназа-барстар с другими системами самосборки на основе белок-белковых взаимодействий показало ее значительное преимущество при сборке надмолекулярных структур в жестких условиях.

Проведено сравнительное изучение модуля барназа-барстар и традиционно используемой высокоаффинной пары стрептавидин-биотин в применении к задачам проекта и другим приложениям молекулярной и клеточной биологии. Специфичность и чувствительность биоанализа с применением высокоаффинных молекулярных пар зависит в первую очередь от константы диссоциации их молекулярного комплекса. Практически универсальными возможностями использования в области нанотехнологий и протеомики, обладает высокоаффинная пара авидин:биотин ( $KD \sim 1 \text{ fM}$ ). В настоящей работе предложена альтернатива этой молекулярной паре - высокоаффинная белковая пара барстар:барназа ( $KD \sim 10 \text{ fM}$ ). На модели двустадийного флуоресцентного иммуноанализа на микрочипах было показано, что использование пары барстар-барназа позволяет значительно снизить существенный фон за счет неспецифического связывания с твердой подложкой, характерный для компонентов пары [стрепт]авидин:биотин. Таким образом, показано, что пара барстар:барназа является хорошей основой для высокоточного иммуноанализа и исследований редких событий в нанопроотеомике.

Для прижизненной оптической визуализации опухолей молочной железы человека сконструированы новые гибридные комплексы на основе инновационных неорганических наночастиц, нанофосфоров, и противоопухолевых мини-антител. Показано, что полученные люминесцентные комплексы эффективно и специфично метят опухолевые клетки аденокарциномы молочной железы человека SKBR3 с оптическим контрастом 10:1 против отрицательного контроля. На экспериментальной модели показана возможность оптической детекции опухолевых клеток с помощью полученных адресных наноконструкций на глубине 4 мм.

Продолжена разработка магнитных наночастиц (МНЧ), оснащенных адресными элементами и/или специальным покрытием, для доставки к клеткам-мишеням. Созданы МНЧ с полиэтилениминовой полимерной оболочкой; полученные МНЧ

охарактеризованы методами рентгенодифракционного анализа, электронной микроскопии, динамического и электрофоретического светорассеяния.

Продемонстрировано активное взаимодействие полученных МНЧ с опухолевыми клетками SKOV3, которые приобретают в результате способность к перемещению под действием постоянного магнита. С помощью физических неинвазивных методов изучена биодеградация магнитных наночастиц в организме модельных животных.

## **Структурно-функциональные исследования протеиназ, осуществляющих процессинг белков и регуляцию клеточных функций.**

### **Протеиназы социально опасных заболеваний**

#### ***Лаборатория химии протеолитических ферментов***

##### **АТФ-зависимый протеолиз**

Продолжено изучение АТФ-зависимой Lon-протеазы (Lon) – ключевого фермента внутриклеточной селективной деградации белков в *Escherichia coli*.

Разработаны методики экспрессии в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) растворимых форм рекомбинантных модификаций *EcLon*-протеазы, несущих гексагистидиновые фрагменты на С-конце последовательности, – Lon-H6, Lon-S679A-H6, Lon-R192A-H6 и Lon(107-784)-H6 (d106-Lon-H6). Соответствующие белки получены в очищенном состоянии, охарактеризованы их ферментативная активность и конформационное состояние. Установлено, что как утрата N-концевого домена, так и мутация консервативного остатка аргинина в «длинной» спирали coiled-coil(CC)-участка мало влияют на протеазную функцию фермента. Обнаружена повышенная склонность Lon-R192A-H6 к автолизу, что свидетельствует об изменении конформационного состояния мутанта по сравнению с интактным ферментом.

Построена трехмерная модель потенциальной димерной формы фрагмента (1-245) *EcLon*-протеазы, позволяющая выявить сайты, предположительно важные для межсубъединичных взаимодействий, с целью их последующей направленной мутации.

##### **Протеиназы экстремофилов**

###### **а) психрофильная протеиназа из микроорганизма *Serratia Proteamaculans***

Разработана методика ограниченного протеолиза психрофильной олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* (PSP) в 50%-ном глицерине с использованием как растворимого химотрипсина, так и иммобилизованного на сорбенте МПС-ПА (МПС-ПА-Хтр). С помощью блоттинга на иммобилоне определена N-концевая последовательность продукта химотрипсинолиза PSP. Показано, что ограниченный протеолиз с помощью химотрипсина происходит после нескольких близкорасположенных остатков тирозина (97 и 101) и фенилаланина (91). Преобладающими продуктами химотрипсинолиза являются PSP 92-677 и PSP 101-677. По данным электрофореза в ПААГ, химотрипсинолиз белковой молекулы PSP (11 мкМ) с образованием укороченной формы PSP 92/101-677 не превышает 30%, даже после нескольких суток инкубации.

Показано, что укороченный вариант препарата PSP эффективно гидролизует азоказеин. Полноразмерный фермент практически не способен гидролизовать азоказеин, что подтверждает наши предположения, что N-концевая «скобка» (около 100 аминокислотных остатков), которая, по данным

теоретических расчетов, удерживает конформацию каталитического домена PSP, препятствует гидролизу высокомолекулярных субстратов.

Проведена искусственная реконструкция природного комплекса PSP с шаперонином из *S. proteamaculans*, обнаруженного ранее при выделении PSP: получен прочный комплекс (1:1) шаперонина GroEL *E. coli* с активным рекомбинантным ферментом PSP. Исследовано влияние температуры и состава реакционной среды, а также комплексообразования с шаперонином GroEL *Escherichia coli* на скорость инактивации фермента. Обнаружено, что комплексообразование с шаперонином повышает термостабильность PSP. Обнаружен эффект термостабилизации PSP глицерином при 37-50°C. Выявлено, что ионы кальция и буферные растворы низкой молярности вызывают противоположный эффект – ускоряют инактивацию PSP при повышенных температурах.

#### **б) термостабильные протеиназы из кишечника личинок жука-кожееда *Dermestes maculatus*.**

Продолжена работа по получению рекомбинантного белка катепсина L *Dermestes maculatus*. Созданы три конструкции, содержащие ген, кодирующий катепсин pET22-C/ CatL: pET22\_NHis#15/CatL, pET22-C/ CatL и pET22\_full/CatL. Для трансфекции этими плазмидами и последующей экспрессии целевого белка катепсина L выбраны клетки *Escherichia coli*: DE3 и Rosetta. Во всех клетках трансфицированных указанных выше плазмидами отмечали экспрессию белков в области мол.масс 33 и 45 кДа.

#### **Протеаза ВИЧ-1.**

Проведено сравнительное исследование элементарных стадий протеолиза модельных субстратов (FRET-субстрата и хромогенного Dns-субстрата) протеазы ВИЧ-1 дикого типа и мультирезистентных мутантов в присутствии ингибиторов протеазы ВИЧ-1 I-го и II-го поколений методом остановленного потока. При сравнении эффективности ( $k_{cat}/K_M$ ) расщепления обоих субстратов всеми формами протеазы ВИЧ-1 на порядок быстрее происходит гидролиз FRET-субстрата, по-видимому, этот сайт расщепления при процессинге вирусных белков протеазой ВИЧ-1 является предпочтительным.

Ингибиторы 1 и 2 типа имеют принципиальное отличие в характере связывания различными вариантами HIV протеазы. При связывании ингибиторов 1 типа наиболее важной стадией является стадия первичного залипания ингибитора (разница между саквинавиром (1 тип) и даруновиром (2тип) в  $k_1$  всеми вариантами HIV PR составляет 2 порядка), тогда как для дарунавира наиболее быстро происходит закрытие флепов ( $k_2$  примерно на 2 порядка ниже, чем при связывании саквинавира).

#### **IgA1 протеаза из *Nesseria meningitidis***

Исследованы иммуногенные и протективные свойства фрагментов IgA1 протеазы (ХТР1, ХТР2, ХТР3, ХТР4), полученные ограниченным протеолизом полноразмерного фермента химотрипсином. Полученные фрагменты отличались по молекулярной массе, причем, образец ХТР3 содержал только N-концевые фрагменты молекулы IgA1 протеазы, а ХТР4 – только С-концевые участки белка.

Все образцы обладали способностью защищать иммунизированных ими мышей от заражения живой культурой менингококков серогруппы В.

Во всех группах мышей, иммунизированных полученными фрагментами, показана выраженная защита лабораторных животных от заражения живой культурой менингококков серогруппы В.

#### **Теоретические исследования в области механизма действия протениаз. Компонент комплемента**

#### **C1q.**

Существующие теоретические методы не позволяют определять неизвестный сайт связывания белкового рецептора с низкомолекулярными ингибиторами для предсказания параметров их взаимодействия в случае, когда этот сайт невозможно выделить среди других участков белковой молекулы по энергетическим и стерическим параметрам. Разработали метод поиска неизвестного, не обособленного структурно сайта связывания низкомолекулярных ингибиторов с белком и предсказания кинетических параметров взаимодействия новых соединений при наличии кристаллографической структуры рецептора и экспериментальных данных о константах взаимодействия ряда ингибиторов. Этот метод применили для определения структурных и кинетических параметров связывания белка C1q с низкомолекулярными лигандами, ингибирующими его взаимодействие с иммунными комплексами. Установлен участок на глобулярной части C1q, взаимодействие которого с отрицательно заряженными низкомолекулярными лигандами, возможно, приводит к ингибированию активации комплемента по классическому пути. Он характеризуется положительно заряженными аминокислотными остатками Arg150 цепи В, а также Lys160 и His167 цепи С. Лиганды, ингибирующие связывание C1q с иммунными комплексами, можно использовать в составе лекарственных средств для терапии патологических состояний, связанных с нежелательной активацией системы комплемента: аллергических реакций, отторжения трансплантированных органов и др.

### **Синтез новых модуляторов клеточной активности на основе нейрוליпинов и их производных, несущих заряженную группу**

#### ***Лаборатория оксипинов***

Были синтезированы амиды жирных кислот (арахидоновой, олеиновой, пальмитиновой, докозагексаеновой) с 2-аминоэтансульфоновой кислотой (таурином). Некоторые из этих веществ были ранее обнаружены в организмах млекопитающих, однако спектр их биологической активности остаётся малоизученным. В тесте на цитотоксическое действие по отношению к линиям раковых клеток данные соединения не проявили заметной активности. Так, на клетках глиомы С6 крысы для олеилтаурина  $IC_{50} > 100$  мкМ. Также не было отмечено нейрозащитного действия указанных веществ в модели калиевой депривации на первичной культуре нейронов мозжечка. В модели острого патологического состояния

организма, вызванного действием яда гюрзы, было установлено, что, в отличие от свободного таурина, его ацилированные производные усиливают действие яда за счет повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера.

Были изучены также и другие вещества, несущие заряженную группу, как природного происхождения, так и синтетические производные. В тестах по определению нейрозащитного действия этих соединений было установлено, что в большинстве моделей, вещества, в структуре которых содержится свободная карбоксильная группа, за редким исключением, не проявляли заметного нейрозащитного эффекта. Однако, некоторые из этих соединений были активны в тесте по влиянию на локальный мозговой кровоток. Так, природный простагландин E<sub>2</sub> в дозе 0.1 мг/кг усиливал кровоток как у интактных (ложнооперированных) животных, так и у животных в условиях глобальной преходящей ишемии. Синтезированный нами конъюгат простагландина E<sub>2</sub> и гамма-аминомасляной кислоты проявлял активность только в условиях ишемии и не оказывал влияния на локальный мозговой кровоток у интактных животных, причём этот эффект был в два раза более выраженным, чем в случае немодифицированного простагландина E<sub>2</sub> и реализовывался через рецепторы гамма-аминомасляной кислоты, что принципиально отличает данный конъюгат от природного простагландина. Ранее нами было установлено, что конъюгат простагландина E<sub>2</sub> и гамма-аминомасляной кислоты обладает умеренным нейрозащитным действием в тесте глутаматной токсичности (EC<sub>50</sub> 10 мкМ). Сочетание способности нормализовать локальный мозговой кровоток только в условиях ишемии и защищать нейроны от токсического действия глутамата делает данный конъюгат перспективным для создания нового противоишемического препарата.

Кроме того, продолжались исследования нейрозащитных свойств природных ацилдофаминов в моделях нейронной сети первичной культуры гиппокампа при моделировании гипоксии, которые показали, что ацилдофамины способны нормализовать электрическую активность нейронов, нарушенную введением глутамата, и что этот эффект опосредован их взаимодействием с каннабиноидными рецепторами первого типа.

В теоретическом плане продолжена разработка концепции гибридных мультифункциональных лекарственных препаратов и гипотезы о существовании липидной противораковой системы.

## **Синтез новых противоопухолевых веществ липидной природы, создание и исследование форм их адресной доставки в опухоли**

### ***Лаборатория химии липидов***

Синтезированы по разработанным ранее методикам липофильные пролекарства (ЛП) метотрексата и мелфалана, а также липофильный гликоконъюгат тетрасахаридного лиганда селективов Sialyl Lewis X (SiaLe<sup>X</sup>) – вектор для получения адресных лекарственных липосом.

Разработан синтез флуоресцентного BODIPY-меченого аналога диглицеридного производного метотрексата – зонда для изучения внутриклеточного транспорта липофильного пролекарства метотрексата.

Исследованы взаимодействия липосом с ЛП метотрексата и мелфалана с компонентами плазмы крови человека. Обнаружено, что модификация поверхности липосом при встраивании в бислои того или иного ЛП определяет набор белков плазмы крови, вовлеченных во взаимодействие с липосомами, что, в свою очередь, отражается на функционировании протеолитических каскадов систем комплемента и коагуляции. В частности, обнаружено, что связывание фрагментов компонента C3 и фактора Н системы комплемента человека характерно только для липосом с 10 мол. % ЛП метотрексата (при уменьшении нагрузки бислоя до 2.5 мол. % ЛП метотрексата связывания этих белков не происходит). Различия в профилях связывания белков коррелируют с опубликованными нами ранее данными об активации системы комплемента в тестах *in vitro*.

В культурах 4-х линий опухолевых клеток человека исследованы биологические эффекты (антипролиферативная активность и проапоптотический потенциал) новых триазол-содержащих липофильных аналогов колхициноидов в липосомальных формах. Исследованы особенности взаимодействия липосом различного состава с нативными клетками сосудистого эндотелия пупочной вены человека (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells). С помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии показано, что активированные фактором некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ) эндотелиальные клетки, в отличие от неактивированных, специфически связывают SiaLe<sup>X</sup>-липосомы.

Исследован противоопухолевый эффект адресных липосом с ЛП антимитотического агента, блокатора тубулина, комбретастина А4 на модели острого лимфолейкоза мышей. Показано, что ЛП в липосомальной форме превосходит исходный комбретастин А4 по торможению роста лимфомы, а в случае адресных липосом -- и по сохранению неповрежденных лимфоузлов.

Исследована локализация лекарственных SiaLe<sup>X</sup>-липосом (ЛП – диглицеридное производное мелфалана) *in vivo*, на модели карциномы легких Льюиса. Показано, что в отсутствие адресного лиганда липосомы накапливаются в опухолевой ткани за счет пассивного транспорта, в то время как введение SiaLe<sup>X</sup>-конъюгата в состав цитотоксических липосом обеспечивает их активный транспорт к эндотелию опухолевых сосудов, вызывая повреждение последних по механизму апоптоза.

## **Синтез новых флуоресцентных зондов; изучение с их помощью строения и функций мембран и взаимодействий лекарственных липосом с клетками; изучение**

### **апоптотических процессов в клетках**

### ***Лаборатория химии липидов***

С применением набора флуоресцентномеченых фосфо- и гликолипидов, в сотрудничестве с коллективом, возглавляемым проф. Р.Брауном (ун-т Миннесоты, США) проведено всестороннее изучение вновь открытого переносящего церамид-1-фосфат (С1Р) белка (СРТР), широко распространенного в клетках тканей млекопитающих. Показано, что СРТР через посредство С1Р модифицирует активность фосфолипазы А2 и тем воздействует на биосинтез эйкозаноидов.

С применением флуоресцентномеченых гликолипидов и в сотрудничестве с проф. Р.Брауном (США) исследована роль димеризации гликолипид-переносящего белка (GLTP) в его функционировании. Также с применением флуоресцентных зондов и монослойной методологии изучен механизм стимулирования активности GLTP фосфолипидами; продолжено изучение функциональных особенностей аналога GLTP, белка HET-C2 из гриба *Podospora anserina*.

Разработан удобный синтез необходимых для вышеуказанных исследований флуоресцентномеченых аналогов церамид-1-фосфата.

Получен флуоресцентный периленоил-меченый аналог противоопухолевого агента 5-фторурацила, предназначенный для проведения биофизических исследований. Продолжено исследование с помощью флуоресцентных зондов взаимодействия фосфолипидных мембран с белками.

В порядке усовершенствования ранее разработанной с Кардиоцентром РАМН аналитической методики определения активности секреторной фосфолипазы А2, разработана кинетическая модель, описывающая поведение зонда в сыворотке, содержащей указанный фермент. Это дало возможность описать данные экспериментов, полученные на сыворотке крови больных с диагнозом ишемической болезни сердца (готовится публикация).

Синтезирован новый флуоресцентный ганглиозид GM1, меченный BODIPY-FL- меткой по полярной части молекулы и содержащий остаток С24:0 жирной кислоты в неполярной части.

## Гликоландшафт эукариотической клетки

### Лаборатория углеводов

**Синтез ряда липофильных производных сиалогликанов, отличающихся жесткостью конформации линкера между липидом и гликаном, а также его длиной.** Разработана методология (общий подход) получения синтетических гликолипидов с заданными свойствами. Данный подход позволяет: синтезировать гликолипиды с любой природой гликана, в том числе с сиалированными олигосахаридами, полисахаридами (например, гиалуроновой кислотой), гликопептидами; с использованием той же методологии синтезировать липофильные производные пептидов, в том числе гидрофобных пептидов; получать производные, которые хорошо диспергируются в воде независимо от размера и гидрофильности лиганда (то есть, лигандом может быть гидрофобный пептид); это свойство является критическим для встраивания молекулы (и тем самым – лиганда) в мембрану живой клетки; варьировать природу липидной части, в частности, получать производные насыщенных и ненасыщенных жирных кислот с двумя насыщенными или ненасыщенными жирными кислотами, с холестерином; получать молекулы с запрограммированным расстоянием между липидной частью и лигандом, что затем используется для адресного введения лиганда в тот или иной участок гликокаликса клетки – непосредственно прилегающий к плазматической мембране, несколько удаленный от нее, или выведенный на периферию гликокаликса.

Получены активированные производные фосфатидилэтаноламина (ФЭ), где остаток ФА присоединен к коровому участку, к которому присоединены также три антенны необходимой длины, на конце каждой из которых расположен остаток активированного эфира карбоновой кислоты. Путем присоединения к нему трех остатков гликана (по каждой из антенн) получены трехвалентные гликолипиды с заранее заданным расстоянием между лигандами. Это расстояние регулируется длиной самой антенны (которая варьируется), и является реальным, а не теоретически возможным, так как природа антенн выбрана таким образом, чтобы гарантировать максимальную жесткость как самих антенн, так и всей конструкции в целом. Из приведенного выше активированного липида были получены также трехвалентные пептиды.

Лектины, экспрессируются на различных типах клеток, они опосредуют передачу межклеточных сигналов, в том числе адгезию, апоптоз, регуляцию клеточного цикла. Мы изучили расположение в клеточной мембране галектинов прото- (галектин-1), химерного (-3) и тандемного типов (-4, -8, -9) и выяснили, что углеводсвязывающий профиль этих белков в составе клетки намного уже, чем в бесклеточных тест-системах. Более того, аффинность галектинов к гликанам зависела от типа клеток, на которые они были нагружены. Полученные данные позволили нам предположить, что галектины в составе клетки маскированы *цис*-гликанами. С помощью конфокальной микроскопии исследована локализацию галектинов в гликокаликсе. Пэтчинг вероятнее всего не связан с индуцированием галектинами образования гликокластеров. В пользу этого свидетельствует тот факт, что N-однодоменные галектины -4, -8 и -9, у которых нет возможности связываться с внешними гликанами, также выявляются в пэтчах. Еще одним важным выводом данного исследования является то, что галектины глубоко погружены в гликокаликс клетки, что делает их доступными для связывания с *цис*-гликанами и затрудняет взаимодействие с экзогенными гликанами. Таким образом, данное исследование подтверждает, что в гликокаликсе галектины маскированы *цис*-гликанами тех же клеток, что объясняет избирательность связывания галектинов с *транс*- гликанами.

Синтезированы аффинные сорбенты, где в качестве биоспецифического лиганда выступает высокомолекулярная или среднего молекулярного веса гиалуроновая кислота, или олигосахариды – фрагменты гиалуроновой кислоты, включая минимальный, дисахаридный фрагмент. С помощью этих сорбентов из суммарных иммуноглобулинов человека были выделены и охарактеризованы по специфичности антитела

(сумма IgG+IgM). Оказалось, что большая часть человеческих антител этого вида принадлежит к классу M и узнает дисахаридный фрагмент гиалуроновой кислоты (не связываясь с собственно гиалуроновой кислотой как полимером). В то же время, в крови человека есть антитела, взаимодействующие с низко- и высокомолекулярными версиями полисахарида. Последующий анализ индивидуальных сывороток здоровых доноров показал, что данные антитела содержатся только у некоторой части здоровых доноров, а титры их лежат в диапазоне от слабых до средних. Получены высокоочищенные антитела к полимеру в биотинилированном виде – для дальнейшего изучения, в частности, для выявления локализации из мишени.

Разработанный ранее гликоаррэй в виде чипа 2.5x7.5 см с иммобилизованными на нем 400 лигандами гликановой природы был адаптирован для иммобилизации гликопептидов, пептидов и белков. В частности, были иммобилизованы иммуноглобулины и белки, являющиеся известными онкомаркерами, а именно карциноэмбриональный антиген и альфа-фетопротейн. Показано, что иммобилизация проходит с высокой степенью эффективности, и что антигенность белков не теряется из-за их химической модификации и контакта с поверхностью чипа.

Изучалось влияние галектинов на связывание антител (в том числе больших) с вирусом гриппа. Нагрузка галектинов на поверхность вирионов привела к снижению уровня связывания антител. Наибольший ингибирующий эффект проявлял CG-2 и, в меньшей степени CG-1A. Между штаммами вируса также наблюдались различия, в частности, CG-1B выступал как ингибитор только для человеческого, но не птичьего вируса. С помощью галектинов вирус гриппа может предохранять себя от предсуществующих антител организма-хозяина, или по крайней мере ослаблять их действие. Полученные данные представляют несомненный интерес для разработки терапевтических направлений, основанных на применении моноклональных и гетеротипических антител, а также вакцин. Можно ожидать, что галектины, секретируемые клетками при воспалении, как участники иммунного ответа, в значительной степени ослабляют терапевтический эффект.

Был разработан неdestructивный физико-химический метод, основанный на том, что мембрана вируса гриппа содержит липиды. Разработана методология липидов с заданными свойствами, в том числе позволяющая синтезировать гликолипиды с любой природой лиганда; с использованием той же методологии синтезировать липофильные производные к которым относится биотин. Для того, чтобы получать производные, которые хорошо диспергируются в воде независимо от размера и гидрофильности между липидом и биотином введи гидрофильную вставку, представляющую собой олигомер глицина, в котором каждый третий остаток замещен по азоту карбоксиметильной группой. Такой реагент не потерял способности встраиваться в биологическую мембрану, в том числе оболочку вируса гриппа, но в то же время был растворимым в стандартных буферах. Модифицированные вирусы сохраняли способность заражать клетки MDCK на том же уровне, что и нативные вирусы. Степень встраивания была сравнима со степенью модификации вирусов гриппа при его флуоресцентном мечении.

## **Роль инсулин рецептор-подобного рецептора в регуляции функции вставочных клеток почки**

### ***Лаборатория клеточной биологии рецепторов***

Впервые был обнаружен человеческий рецептор из семейства тирозинкиназных рецепторов, который имеет свойство активироваться под действием щелочного pH. Инсулин рецептор-подобный рецептор (insulin receptor-related receptor, IRR) принадлежит к подсемейству инсулиновых рецепторов, в которое также входят инсулиновый рецептор (IR) и рецептор инсулин-подобного фактора роста (IGF-IR). Только IRR, в отличие от его гомологов IR и IGF-IR, способен активироваться под действием щелочного pH. Экспрессия IRR является тканеспецифичной: рецептор обнаружен в почках, поджелудочной железе (в альфа- и бета-клетках) и в желудке. Наибольшее количество IRR выявлено в почках, а именно лишь в субпопуляции эпителиальных клеток, выстилающих дистальные каналцы. Данные клетки, называемые бета-вставочными клетками (beta-intercalated cells), контактируют с почечным фильтратом, pH которого, в отличие от крови, может существенно варьироваться, в том числе и в щелочную сторону. Используя мышей с нокаутом по гену *insrg*, кодирующего рецептор IRR, мы показали, что IRR вовлечен в процессы регулирования кислотно-щелочного баланса в организме, а именно в компенсацию алкалоза. Мы показали, что нокаутные мыши при бикарбонатной нагрузке имеют пониженную экспрессию (приблизительно на 40-50%) обменника пендрин и повышенную экспрессию аквапорина 2 в два раза больше в клетках коры почки по сравнению с мышами дикого типа. Данные результаты указывают на то, что функция рецептора IRR в почках сопряжена с их секреторным потенциалом. Также используя *littermate* мышей дикого типа и нокаутов по рецептору IRR, мы получили транскриптомные профили из срезов почек. В нокаутных мышях в сравнении с мышами дикого типа было обнаружено пониженное (примерно в 1.5 раза) содержание мРНК как минимум 30 белков и также повышенное количество мРНК приблизительно 60 белков. Так, полностью подтвердились данные об измененных уровнях экспрессии белков пендрин и аквапорина 2, то есть экспрессия мРНК гена пендрин приблизительно на 50% меньше в нокаутных мышях, и экспрессия гена аквапорина 2 приблизительно в два раза больше в нокаутах. Еще одним из наиболее интересных результатов анализа транскриптом оказалась в 5 раз повышенная экспрессия гена инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF-2) в почках нокаутных мышей.

Также был проведен анализ линии мышей с направленной инактивацией гена *insrg*, кодирующего рецептор IRR, и выявлены их фенотипические отличия, обусловленные нарушением регуляции кислотно-щелочного равновесия. При индукции экспериментального алкалоза в крови мышей с нокаутом рецептора IRR наблюдалось повышение содержания бикарбоната и CO<sub>2</sub>. Нами было показано, что нокаутные мыши по гену

*insrr* имеют повышенную на 20% массу тела в сравнении с мышами дикого типа ( $27.5 \pm 0.3$  г против  $23 \pm 0.2$  г) при одинаковом потреблении пищи в обеих группах. Масса почек также на 15% выше у нокаутных мышей. Как следствие этого уровень клубочковой фильтрации в почках мышей нокаутного типа выше, чем у дикого типа. Более того, у нокаутных мышей мы обнаружили гораздо более высокий пульс ( $700 \pm 25$  ударов в минуту), чем у мышей дикого типа ( $590 \pm 20$  ударов в минуту). Эти отличия наблюдаются у мышей в возрасте 9-10 месяцев, тогда как у мышей возраста 3-4 месяца мы не видим столь больших отличий. Также для мышей нокаутного типа в возрасте около 10 месяцев характерна значительно возросшая масса жира по сравнению с диким типом. Также наши предварительные данные показывают, что у мышей нокаутного типа со временем развивается гипертония.

Мы картировали участки и отдельные аминокислотные остатки, отвечающие за pH чувствительность рецептора IRR, используя различные химерные белки IRR и IR. Для этого мы разработали методику автофосфорилирования рецептора IRR *in vitro*, что позволило сравнивать нам различными мутантные и химерные белки на основе IRR с pH активностью дикого рецептора IRR. Используя этот метод, мы показали, что как минимум пять аминокислот в первых двух доменах (L1 и C) и третий домен L2 играют важную роль в pH активации. Замена всех этих частей соответствующими доменами IR приводит к уменьшению активности IRR на порядок. Кроме того, кривые pH активации различных химерных и мутантных конструкций разительным образом отличаются от кривой активации IRR и показывают сильное уменьшение кооперативности активации щелочным pH.

## **Исследование действия иммуносупрессирующих пептидов на модели индуцированной системной аутоиммунной патологии у мышей**

### ***Группа экспериментальной биологии с виварием***

Было показано, что циклоспорин А в дозе 50 мг/кг при введении ежедневно в течение трех недель снижает титр аутоантител к ядрышковым белкам у нелинейных мышей, что позволяет заключить об адекватности модели индуцированного хлоридом ртути системного аутоиммунного процесса у генетически разнородных мышей для тестирования потенциальных иммуносупрессорных препаратов для лечения системных аутоиммунных патологий человека.

## **Поиск новых ингибиторов герпесвирусной тимидинкиназы с помощью компьютерного моделирования**

### ***Лаборатория изотопных методов анализа***

Найденный ранее с помощью компьютерного моделирования ингибитор тимидинкиназы ВПГ-1 - дигидроксидихинолин – был протестирован на антигерпетическую активность в системе *in vitro* на культуре клеток Vero. В исследуемом диапазоне концентраций антигерпетическая активность не обнаружена. Используя технологию полногеномного секвенирования ДНК, определена первичная структура гена тимидинкиназы ВПГ-1 в популяции эталонного штамма L2. Определены минорные мутации, связанные с полиморфизмом ВПГ-1. Установлено, что первичная структура гена ТК популяции эталонного штамма ВПГ-1 L2 содержит несколько полиморфных мутаций, не затрагивающих значимые для ферментативной активности участки.

## **Изучение белок-белковых взаимодействий, важных для роста и метастазирования опухолевых клеток**

### ***Группа мембранных биоэнергетических систем и Группа кросс-шивающих ферментов***

Нам удалось показать, что взаимодействие сурвивин-Rap чрезвычайно важно для химиорезистентности глиобластомы – разрушительной опухоли (схожесть клеток глиобластомы со стволовыми вносит вклад в резистентность к терапии). Показано, что сурвивин и Rap имеют высокий уровень экспрессии в тканях с глиобластомой, особенно в связи с окружающими кровеносными сосудами, а также и в культурах клеток глиобластомы. Обработка LLP-3 нарушает комплекс сурвивин-Rap в раковых клетках и прекращает рост глиобластомных сфер *in vitro* и *in vivo*. Это ингибирование зависит от активности каспазы и связано со статусом p53 внутри клеток. Иммуногистохимия указывает на то, что экспрессия сурвивина особенно сильно повышается в повторных глиобластомах в сравнении с недавно диагностированными опухолями, а также что темозоломид-резистентные глиобластомные сферы имеют высокую чувствительность к LLP-3. Таким образом, нарушение комплекса сурвивин-Rap при помощи LLP-3 препятствует выживанию и росту глиобластомных клеток как *in vitro*, так и *in vivo*, тем самым предлагая новый терапевтический подход к глиобластоме. В данном большом исследовании вклад нашей группы заключался именно в исследовании белок-белковых взаимодействий сурвивин-Rap и роли его в апоптозе.

Значительная часть усилий была посвящена поиску новых способов ингибирования активности лизилоксидазы – фермента, играющего роль в метастазировании клеток. Считается, что главной функцией LOX является окисление компонентов внеклеточного матрикса, но LOX обнаружена также и в ядре, причем роль этого ядерной пула LOX до настоящего времени изучена очень слабо. Логично предположить, что LOX может служить мессенджером между ядром и внеклеточными компартментами. По этой причине мы решили исследовать более подробно ранее открытое нами взаимодействие LOX с p66 $\beta$  фактором репрессии транскрипции в составе нуклеосом-моделирующего комплекса Mi-2/NuRD. В этом году нам удалось показать,

что это взаимодействие имеет консервативный характер: каталитические домены всех изоформ лизилоксидазы человека способны взаимодействовать с доменом CR2 белка р66β. Более того, реконструирован интерактом лизилоксидазы с учетом взаимодействия фактора репрессии р66-β с каталитическим доменом лизилоксидазы человека *in vivo* и *in vitro*. На первом этапе произведен скрининг библиотек кДНК на предмет поиска новых интеракторов лизилоксидазы (LOX). Затем проведен индивидуальный анализ и исключение ложноположительных клонов. На третьем этапе проведена интеграция экспериментальных данных, полученных нашей группой, с литературными, в особенности касающихся других интересных интеракторов, таких как белок р66β фактор репрессии транскрипции в составе нуклеосом-моделирующего комплекса Mi-2/NuRD.

Завершена работа, посвященная X,K-АТФазам кожи, в том числе внутриклеточной локализации Na,K-АТФазы эпидермиса. Показано, что Na,K-АТФаза имеет латероапикальное распределение. Кроме того, изучены особенности постнатальной регуляции экспрессии генов семейства X,K-АТФаз и локализации соответствующих белков по мере кератинизации клеток эпидермиса в различных слоях. Изучены особенности внутриклеточной локализации калий, натрий, и протон-транспортирующих мембранных ферментов в клетках эпидермиса позвоночных животных, а также особенности регуляции после рождения, что важно для понимания механизма закисления поверхности кожи.

Кроме того, на основе контроля avidности антител были разработаны способы диагностики вторичных иммунодефицитов, контроля терапии и патогенетически обоснованных персонализированных подходов к выбору фотоиммуномодуляторов для лечения ВИН-ассоциированных заболеваний. Показана перспективность использования низкоинтенсивного лазерного излучения в качестве альтернативного фактора иммунокорректирующей терапии при лечении больных атопическим дерматитом.

## **Молекулярный дизайн и синтез низкомолекулярных биологически активных соединений и их аналогов**

### ***Лаборатория органического синтеза***

Показана применимость стабилизированных карбокатионов в качестве масс-спектрометрических меток для модификации поверхностей и мечения биомолекул - олигонуклеотидов и пептидов.

Получены функциональные производные флуоресцентных красителей для синтеза флуоресцентных ДНК-зондов и флуоресцентной модификации белков.

Разработан реагент, содержащий активированный эфир, флуоресцентный краситель и алифатическую азидогруппу. Этот реагент позволяет проводить контролируемое введение азидогрупп в молекулу белка и последующую модификацию белка с помощью клик-реакции с алкинами.

Получены флуоресцентные производные нуклеозидов с полициклическими гидрофобными заместителями, проявляющие активность против оболочечных вирусов.

В синтезе полициклических каркасных структур с заданными фотофизическими и фотохимическими свойствами разработаны методы синтеза разнообразных иминов

1,4,5,6,7,7-гексахлор-5-норборнен-2,3-дикарбоновой кислоты (22 соединения) и 5-норборнен-2,3-дикарбоновой кислоты (12 соединений). Последний случай представляет особый интерес, поскольку оказалось, что эндо- и экзо-изомеры таких иминов имеют совершенно различные фотохимические свойства.

Продолжена разработка удобных и препаративных методов синтеза трехатомных псевдопептидов – производных карбоксиметил(олиго)глицинов.

Для получения флуоресцентных производных различных экотоксикантов отработаны условия синтеза 7-гидроксикумаринов, содержащих в 4 положении кумаринового ядра хлорметильную, бромметильную, азидометильную и аминометильную группы. Изучаются условия синтеза соответствующих конъюгатов.

Отработаны условия синтеза ключевого соединения класса фенилдигонафталина – диметилового эфира 1,2-дигидро-6,7-дигидрокси-1-(3,4-дигидроксифенил)-нафталин-*транс*-1,2-дикарбоновой кислоты. Ведется целенаправленный поиск защитных групп на фенольные гидроксигруппы с целью дальнейших трансформаций этого соединения.

## **Фундаментальные аспекты биоконъюгации**

### ***Группа биоконъюгации***

Получены амидофосфитные производные ксантеновых флуоресцентных красителей (FAM, JOE, TAMRA; каждое в виде двух индивидуальных изомеров), пригодные для получения флуоресцентно модифицированных олигонуклеотидов. На основе моносульфированных цианиновых красителей Су3 и Су5 получены азидопроизводные, пригодные для модификации алкин-содержащих белков с помощью «клик-модификации» (медь-катализируемого циклоприсоединения азидов и алкинов). Такая модификация не изменяет электрофоретической подвижности белков в геле, что позволяет сравнивать эффективность синтеза различных белков после того или иного воздействия на клетку.

Ранее нами был обнаружен новый класс модифицированных нуклеозидов с противовирусной активностью по отношению к ряду оболочечных вирусов - 5-арилэтинильные производные пиримидиновых нуклеозидов с объёмными ароматическими заместителями. Среди этих соединений особенно активными являются производные пентациклического ароматического углеводорода перилена. Совместно с коллегами из Канады нами предложено арабино-производное периленэтинильного нуклеозида aUY11 в качестве вещества,

не обладающего цитотоксическим и цитостатическим действием в культурах клеток, и проявляющего в то же время значительную ингибирующую активность по отношению к ряду оболочечных вирусов – вирусам гепатита С, герпеса типа 1 и 2, ветряной оспы, различным штаммам вируса гриппа и др. Подтверждено, что механизм противовирусного действия aUY11 определяется его уникальной структурой и состоит в ингибировании слияния вирусной и клеточной мембраны. В настоящее время начинается работа по масштабированию методики получения aUY11 с целью наработки вещества для доклинических исследований.

## **Системный анализ пептидогенеза растений** **Лаборатория протеомики**

Был выполнен полный анализ пептидомов клеток модельного объекта мха - *P. patens*. Мы выделили и проанализировали с помощью высокоточного масс-спектрометрического анализа эндогенные пептиды из клеток гаметофоров, протонемы и протопластов мха *P. patens*. Для экстракции пептидов из гаметофоров мы использовали верхние части растений, растущие над поверхностью питательной среды. Был проведен масс-спектрометрический анализ трех биологических повторов. Такой подход позволил нам идентифицировать в гаметофорах около 4000 тысяч уникальных пептидов, являющихся фрагментами 761 белка. В пептидоме гаметофоров нами были идентифицированы пептиды ряда хлоропластных белков, а также некоторых хорошо известных стрессовых белков, например late embryoogenesis abundant protein (LEA). LEA белки были впервые обнаружены в семенах растений. В клетках протонемы, мы идентифицировали около 4000 уникальных пептидов, являющихся фрагментами 855 белков-прекурсоров. Следует отметить преобладание пептидов, являющихся фрагментами хлоропластных белков, в том числе локализованных в тиллакоидах фотосистемы I и II, а также липоксигеназы, атф-синтазы, цитохрома b559 и ряда других. Среди общих для двух жизненных форм белков - в основном белки, локализованные в хлоропластах. При этом, количество уникальных пептидов выше в протонеме. В гаметофорах основные уникальные белки-прекурсоры это представители семейства LEA-белков, аквапорины, шапероны-подобные белки, в то время как в протонеме среди уникальных, в сравнении с гаметофорами, белками преобладали хлоропластные. Возможно, это связано с высокой скоростью роста протонемы, что приводит к более интенсивному метаболизму белков, связанных с энергетическими процессами в клетке. При сравнении пептидомов протонемы и гаметофоров мы обнаружили, что пулы пептидов у этих двух жизненных форм существенно различаются. Для нас, интересно было оценить, как стрессовые условия могут влиять на пептидом клетки. В качестве объекта для такого анализа были выбраны протопласты мха *P. patens*. Протопласты мха *P. patens* получают при обработке молодой протонемы ферментным препаратом драйзелазы. Мы проанализировали пептидом протопластов мха *P. patens*, для чего выделили пептиды из отмытых в маннитол протопластов. В пептидоме протопластов, мы обнаружили 20 427 уникальных пептида, являющихся фрагментами 1572 белков.

Сравнение с протонемой, из которой выделяются протопласты, указывает на существенное увеличение количества белков-прекурсоров. Количество уникальных пептидов в протопластах при этом также возрастает в несколько раз. При этом, около 19000 уникальных пептидов идентифицировались только в протопластах. Это существенно больше того количества, которое мы идентифицировали в протонеме и гаметофорах. Обработка протонемы драйзелазой в концентрациях, не вызывающих появления протопластов, приводило к увеличению количества пептидов в несколько раз. По-видимому, это указывает на сильный биотический стресс, который испытывают протопласты в процессе выделения. Мы предполагаем, что идентифицированные нами пулы пептидов могут быть связаны с процессами деградации белков в клетке и возможно играют роль в процессах ее жизнедеятельности.

## **Исследование и иммобилизация пептидных лигандов и белков на биочиповой платформе для диагностики инфаркта миокарда** **Группа аналитической химии белка**

- 1) Исследованы спектры флуоресценции на 1-2 стадиях синтеза бутилизотиоцианатных производных аминопропилированного стекла. Модифицированные стекла не излучали флуоресценцию при возбуждении на длине волны 280 нм. В качестве зондов для исследования полноты покрытия использовали фенилизотиоцианат и флюоресцеинизотиоцианат. Спектральный анализ показал присоединение этих компонентов к подложке, что означает наличие поверхностных групп по стадиям 1 и 2 синтеза. Присоединены пептидные лиганды.
- 2) Исследовано связывание целевых белков с подложками при сравнении с бычьим сывороточным альбумином и гемоглобином. Показано, что наблюдается некоторое преимущество связывания целевых компонентов. Однако, на данном этапе работы, не удастся выйти на достаточно высокую селективность.
- 3) Проведена валидация метода путем сравнительного анализа с аналогами, а также при тестировании экспертами. Валидация показывает перспективность данной разработки.
- 4) Разработан критерий диагностики ОИМ по двум маркерам: МВ-КФК и тропонину, который позволяет однозначно определять время от начала ОИМ в пределах от 2-часов до 8 суток.
- 5) В результате исследований создан макет малогабаритного носимого прибора, в котором реализованы новые технические решения изготовления оптического детектирования, обработки данных, конструкции, программного обеспечения, радиосвязи.

## Механизмы регуляции функциональной активности отдельных нейрональных кальциевых сенсоров

### Лаборатория химии белка ФИБХ

На основании имеющихся данных о структурной организации нейрональных кальциевых сенсоров (НКС), было выдвинуто предположение об участии С-концевого сегмента НКС в регуляции кальций-зависимого связывания этих белков с ответным участком в молекуле белка-мишени. Так, в зависимости от своей структуры у разных НКС, этот регуляторный элемент может стабилизировать комплекс НКС с мишенью, как это происходит в случае рековерина (Rc), а может и наоборот препятствовать присоединению НКС к “чужой” мишени, или к участку в молекуле “своей” мишени, предназначенному для другого белка семейства (некоторые эффекторные ферменты, например фоторецепторная гуанилатциклаза E (GC-E), могут одновременно присоединять несколько кальций-сенсорных белков посредством различных сайтов). Для проверки этого предположения в рамках настоящего исследования был использован белково-инженерный подход: создание химерных НКС, в которых произведен обмен последовательностями С-концевых сегментов, с последующим исследованием функциональной специфичности полученных белков. В качестве объектов работы были отобраны несколько НКС, локализованных в нейронах одного типа, т.е. белков, для которых селективность действия приобретает особую актуальность. Были выбраны НКС фоторецепторной клетки: белки активаторы гуанилатциклазы 1 и 2 (GCAP1, GCAP2), и рековерин (Rc), которые были получены ранее. Так же в состав исследуемых объектов был введен родоначальник семейства НКС, белок NCS1, который широко распространен в клетках ЦНС, включая фоторецепторные клетки сетчатки, регулирует активность более десятка белков различной природы и характеризуется наличием наименее структурированного и наиболее подвижного среди НКС С-концевого сегмента. С помощью ко-экспрессии гена NCS1 и гена N-миристоилтрансферазы в бактериальных клетках с последующей очисткой миристоилированного белка из бактериальных продуцентов, был получен гомогенный препарат NCS1. Для проверки соответствия рекомбинантного белка природному аналогу, была исследована термостабильность, а также охарактеризован спектр собственной флуоресценции полученного белка. Показано, что параметры этого спектра соответствуют литературным данным (Cox et al., J. Biol. Chem. 1994; 269:32807). Методом аналитической ВЭЖХ была определена степень миристоилирования полученного белка, которая составила >95%, что также соответствует величинам, полученным ранее (De Cotiis et al., Protein Expr. Purif. 2008; 61:103). Для того, что бы исследовать возможную роль С-концевых сегментов GCAP2 и рековерина в свойствах этих белков, были получены их С-концевые химерные формы (Rc-C-GCAP2 и GCAP2-C-Rc), и изучено влияние этих форм на активность родопсинкиназы (RK). Показано, что произведенный обмен последовательностями С-концевых сегментов между рековерином и GCAP2 приводит к обмену функциональными специфичностями между этими белками. Так, введение С-концевого сегмента GCAP2 в структуру рековерина (химера Rc-C-GCAP2) придает последнему способность активировать родопсинкиназу в отсутствие кальция, в то время как GCAP2 с интегрированным С-концевым сегментом рековерина (химера GCAP2-C-Rc) приобретает свойства ингибитора родопсинкиназы при насыщающей концентрации катиона. Химера Rc-C-GCAP2 обладает существенно сниженной способностью ингибировать активность фермента в присутствии кальция, т.е. ее поведение в этих условиях является аналогичным поведению делеционного мутанта рековерина 2-190 с удаленным С-концевым сегментом (Zernii et al., Biochem. J. 2011, 435:441). Переход Rc-C-GCAP2 из активирующей в ингибирующую форму происходит в диапазоне  $[Ca^{2+}]_{своб.}$  от 300 нМ до ~7 мкМ. Поскольку по нашим данным рековерин и GCAP2 взаимодействуют с разными участками родопсинкиназы, можно предположить, что структура С-концевых сегментов этих белков построена таким образом, чтобы повысить эффективность узнавания каждым из этих НКС именно своего уникального сайта в молекуле фермента.

## Изучение субстратной специфичности бактериолитических ферментов, продуцируемых бактерией *Lysobacter* sp. XL1: бактериолитический фермент L5

### Лаборатория химии белка ФИБХ

1. Произведена наработка рекомбинантного бактериолитического фермента L5 в количестве, достаточном для проведения намеченных исследований.

2. Показано, что достаточно широкий спектр бактериолитической активности рекомбинантного бактериолитического фермента L5 совпадает с таковым для фермента L5, выделенного из культуральной жидкости бактерии *Lysobacter* sp. XL1. Показано литическое действие фермента на ряд живых клеток как грамположительных, так и некоторых грамотрицательных бактерий, а также на некоторые виды дрожжей. Фермент L5 показывает более широкий спектр литической активности при обработке автоклавированных бактериальных клеток. При использовании синтетических субстратов для мурамидаз и эндопептидаз было установлено, что фермент L5 не является мурамидазой, но проявляет эндопептидазную активность. Для изучения пептидазной специфичности фермента, основываясь на литературных данных о структуре пептидов и межпептидных мостиков пептидогликанов бактериальных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также учитывая особенности структуры пептидогликанов отдельных видов бактерий внутри этих групп, сформирован список модельных пептидов, соответствующих фрагментам пептидных мостиков пептидогликанов клеточных стенок некоторых бактерий, которые, как было установлено, лизируются внеклеточным бактериолитическим ферментом L5.

3. За отчетный период были синтезированы следующие соединения, необходимые для синтеза пептидов: Z-L-Ala-OH, Z-D-Ala-OH, Z-Lys(Z)-OH, Tos-H-Gly-OBzl, Tos-H-L-Ala-OBzl, Tos-H-D-Ala-OBzl, Z-D-Glu(OH)-OH, получены некоторые дипептиды из намеченного списка: L-Ala-Gly, L-Ala-D-Glu, D-Ala-D-Ala.

### **Структурно-функциональные особенности межклеточных взаимодействий в тканях применительно к биотехнологии и тканевой инженерии** *Лаборатория химии белка ФИБХ*

В качестве исходных объектов выбраны модельные структуры моно-, ди-, тетра- и октамеров пептидов класса 2.2.1 (KADA)<sub>4</sub>, (RAEA)<sub>4</sub>, (KAEA)<sub>4</sub>, (RADA)<sub>4</sub>, (RADA)<sub>2</sub>, (RLDL)<sub>4</sub> и (KLEL)<sub>2</sub> в  $\beta$ -конформации. Изучаемые структуры были получены в результате молекулярного докинга. Анализ МД мономеров и комплексов пептидов проводили в системах с явным водным окружением, в октаэдрических ячейках периодических граничных условий и силовом поле AMBER ff03 при температуре 300 К и давлении 1 атм. Силовые параметры молекул воды соответствовали модели TIP3P. Были получены равновесные траектории движения атомов в составе моно-, ди-, тетра- и октамеров полярных пептидов длиной 10 нс с шагом по времени 0.2 пс. Удалось подтвердить положение о том, что использование уравнений RISM-CMBK позволяет описать распределение молекул растворителя вокруг биологической структуры, геометрия которой подвержена температурным флуктуациям, что, в принципе, позволяет успешно решать задачи, требующие при использовании традиционных подходов неприемлемо больших вычислительных мощностей.

Показано, что с ростом уровня организации пептидных комплексов растет стабильность составляющих его мономеров. Следует отметить, что абсолютные величины свободной энергии, полученные разными способами, значительно различаются. Неожиданными оказались результаты использования методов TPT(R12) и TPT(WCA), которые совершенно выпадают из общей логики процесса самоорганизации полярных пептидов в водных растворах.

В результате применения численного термодинамического интегрирования и отталкивательной поправки  $\gamma^{12}$  удалось определить во всех случаях изменения свободной энергии INT(R12), адекватные по величине и показывающие правильный знак. В случае поправки WCA получены сопоставимые величины, однако процесс филаментообразования охарактеризовать не удастся, что видно из энергии образования октамеров из тетрамеров (RLDL)<sub>4</sub> и (RAEA)<sub>4</sub>. Таким образом, приближенные выражения избыточного химического потенциала TPT(R12) и TPT(WCA) недостаточно учитывают отталкивательную поправку и неприменимы для исследования комплексных структур содержащих заряженные группы атомов. Необходимо выполнять численное термодинамическое интегрирование, которое для больших систем возможно только в рамках метода RISM-CMBK. Полученные величины свободной энергии пептидных комплексов позволяют оценить эффективность связывания компонентов протофиламентов. Величина энергии взаимодействия тетрамеров пептидов может в целом отражать стабильность формируемых наноструктур.

### **Синтез пептидов - агонистов неопиоидного рецептора бета-эндорфина и изучение их активности при действии различных экстремальных факторов** *Лаборатория пептидных биорегуляторов ФИБХ*

Исследована активность селективного агониста неопиоидного рецептора бета-эндорфина синтетического пептида TPLVTLFK, соответствующего фрагменту 12-19 бета-эндорфина (авторское название - октарфин), на модели инфаркта миокарда у крыс. Установлено, что при интраназальном введении в дозах 2-20 мкг/кг один раз в сутки в течение 7 дней после экспериментального инфаркта миокарда (ЭИМ) пептид оказывает выраженное противоишемическое действие, улучшает коронарный кровоток, повышает сократительную активность миокарда, снижает интенсивность перекисного окисления липидов, способствует повышению уровня антиоксидантной защиты. По выявленным фармакологическим эффектам октарфин был сопоставим со стандартным препаратом - антигипоксантом Рибоксином, а по некоторым показателям (улучшение коронарного кровотока, стимуляция антиоксидантной защиты) даже его превосходил. Кроме того, был получен меченный тритием октарфин с удельной активностью 28 Ки/ммоль и изучено его взаимодействие с мембранами миокарда крысы в норме и после ЭИМ. Было установлено, что [<sup>3</sup>H]октарфин с высоким сродством и специфичностью связывается с неопиоидным рецептором бета-эндорфина на мембранах миокарда крысы,  $K_i = 1,6$  нМ. Через 24 ч после инфаркта миокарда аффинность связывания [<sup>3</sup>H]октарфина с рецептором снижалась:  $K_d = 3,3$  нМ. Интраназальное введение крысам немеченого октарфина в дозе 20 мкг/кг сразу после инфаркта приводило к частичному восстановлению способности рецептора связывать [<sup>3</sup>H]октарфин,  $K_d = 2,3 \pm 0,3$  нМ. Таким образом, октарфин потенциально пригоден для разработки на его основе препарата для лечения ишемической болезни сердца, перенесенного инфаркта миокарда и миокардиодистрофии (снижения функциональной способности сердечной мышцы).

### **Оптимизация методов синтеза биологически-активных пептидов (HLDF-6, леупролида, трипторелина)**

#### *Лаборатория химии пептидов ФИБХ*

Масштабирование процесса получения амидной формы пептида HLDF-6 осуществлено с использованием конвергентной схемы синтеза с разбиением процесса на получение трёх дипептидов (Boc-Thr-Gly-OH,

Glu(OtBu)-Asn и His(Trt)-Arg-OH. В ходе работ по масштабированию синтеза дипептида Boc-Thr-Gly-OH осуществлено сравнение методов как с использованием защитной группы С-конца глицина, так и без защитной группы. Проведены работы по поиску оптимальных условий конденсации соответствующих производных. Найден короткий путь синтеза дипептида Glu(OtBu)-Asn. Проведены работы по поиску подходящих защитных групп с целью повышения выхода дипептида.

В ходе работ по масштабированию синтеза дипептида His(PG1)-Arg-NH<sub>2</sub> проведён поиск а) активированного производного гистидина (выбор защитной группы PG1 и метода активации), б) С-защищённого производного аргинина в стадии конденсации с производным гистидина и в) осуществлён поиск метода селективного удаления Boc-группы и завершение синтеза Boc-His(PG1)-Arg-NH<sub>2</sub> (PG1 = Trt).

Проведены поисковые работы метода получения конечного продукта, амидной формы пептида, HLDF-6: а) масштабирование синтеза Boc-Thr-Gly-Glu(OtBu)-Asn-OH; б) масштабирование синтеза Boc-Thr-Gly-Glu(OtBu)-Asn-His(Trt)-Arg-NH<sub>2</sub> и в) масштабирование процессов удаления защитных групп и очистки пептида.

Отличительными чертами схемы являются доступность исходных реагентов, высокие выходы промежуточных продуктов, а следовательно, относительная дешевизна процесса. Кроме того, конвергентность схемы означает, что синтез фрагментов может проводиться параллельно, что сокращает время наработки продукта. Схема масштабирования процесса получения амидной формы пептида HLDF-6 позволяет осуществлять синтез целевого продукта в количествах необходимых для проведения доклинических испытаний.

## **Исследование механизма взаимодействия кальций связывающего белка акворина с его функциональным партнером – зеленым флуоресцентным белком (GFP)**

### ***Группа биоинженерии репортерных белков ФИБХ***

Получен ряд генно-инженерных конструкций, кодирующих гибридный белок eGFPAeq, содержащие мутации в донорном модуле (акворине). Исследование физико-химических свойств полученных мутантных белков позволили локализовать аминокислотные остатки, ответственные за Ca-индуцированное взаимодействие донорного модуля с eGFP. Эти результаты в совокупности с результатами по мутагенезу eGFP позволяют предположить, что высокоэффективный перенос энергии биолюминесценции в гибридном белке eGFPAeq осуществляется посредством “слабых” взаимодействий боковых радикалов аминокислот GFP, направленных наружу в акцепторном модуле с боковыми радикалами аминокислот в модуле акворина. Такие взаимодействия ограничивают свободу перемещений донора и акцептора в составе гибридного белка. В результате пространственной заторможенности хромофора eGFP (акцептор) и хромофора целентаразина в акворине (донор) находятся в одной плоскости, что является оптимальным условием переноса энергии по теории Ферста. Специфическое взаимодействие перечисленных аминокислотных остатков посредством белков ингибирует перенос энергии биолюминесценции.

Для изучения ингибирования белками переноса энергии биолюминесценции химически модифицированных мутантных форм гибридного белка eGFP-Aeq были выбраны четыре антигена-микотоксины: афлатоксин, зезаралинон, охратоксин и фуманизин, против которых доступны моноклональные антитела. Разработан универсальный метод препаративного выделения антител из асцитных жидкостях с помощью ионообменной жидкостной хроматографии, исключающей применение жестких денатурантов, таких как кислота и роданид натрия. Выделены и наработаны антитела для четырех микотоксинов. По материалам выделения антител готовится публикация.

Разработаны методы химической активации микотоксинов афлатоксина, зезаралинона, охратоксина и фуманизина на основе малеиноимидного производного, специфически взаимодействующего с нужными аминокислотами поверхности гибридного белка GFP-акворин. Для каждого производного микотоксина разработаны способы их очистки от побочных продуктов реакции.

## **Молекулярная генетика, механизмы реализации генетической информации, биоинженерия (58)**

### **Исследование адаптивного иммунитета**

#### ***Лаборатория сравнительной и функциональной геномики и Лаборатория геномики адаптивного иммунитета***

Проведен глубокий сравнительный анализ индивидуальных репертуаров Т-клеточных рецепторов (ТКР) для группы монозиготных близнецов. С использованием разработанной стратегии получения, широкомасштабного секвенирования и специализированного биоинформатического анализа репрезентативных библиотек кДНК α- и β-ТКР реконструированы индивидуальные репертуары периферических Т-лимфоцитов для четырех пар монозиготных близнецов и проведен исчерпывающий сравнительный анализ полученных репертуаров. Установлено, что а) Т-клеточные репертуары близнецовых пар не отличаются от пар неродственных индивидов по числу совпадений в клональном разнообразии общего пула Т-лимфоцитов, б) функционально активная часть репертуаров у монозиготных близнецов значительно обогащена идентичными по структуре антиген-распознающих участков α- и β-ТКР (CDR3-участки) клонами Т-лимфоцитов; такие Т-

клеточные клоны равновысоко представлены в индивидуальных репертуарах каждого из пары близнецов, в) часть идентичных для близнецовой пары Т-клонов несет зрелые гены ТКР с синонимичными заменами в нуклеотидной последовательности CDR3-участков, что свидетельствует о независимом образовании, но сходной селекции в тимусе и пост-тимусной клональной экспансии у монозиготных близнецов, г) генетическая идентичность близнецовой пары определяет предпочтительный выбор конкретных групп V-сегментов при сборке генов  $\beta$ -ТКР и своеобразии тимусной селекции Т-клонов при подборе зрелых генов  $\alpha$ -ТКР. Полученные результаты существенно обогащают современные представления о вкладе генетических факторов в ключевые этапы процесса формирования адаптивного иммунитета человека.

**Разработано открытое программное обеспечение для анализа данных массивированного секвенирования Т-клеточных рецепторов, MiTCR: <http://mitcr.milaboratory.com/>.** Программный пакет MiTCR, опубликованный в журнале Nature Methods (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23892897>) не имеет мировых аналогов ни по скорости, ни по качеству, ни по объему обработки сырых данных массивированного секвенирования репертуаров Т-клеточных рецепторов. В MiTCR реализованы новые быстрые и универсальные алгоритмы для анализа данных секвенирования Т-клеточных рецепторов и коррекции содержащихся в них ошибок. Программа сделана так, чтобы ее мог использовать любой биолог для своих исследований. Она позволяет получать биологически значимые данные, корректно и эффективно удаляя имеющиеся в исходных сырых данных ошибки ПЦР и секвенирования.

## **Структурный, функциональный и эволюционный анализ геномов и его применение в биотехнологии**

### ***Лаборатория структуры и функции генов человека***

Полученные ранее нами промоторные области генов CDC6, POLD1, CKS1B, MCM2, PLK1 и PCNA человека, включающие кор-промотор и примыкающую (дистально по отношению к точке начала транскрипции) потенциальную регуляторную область, клонировали в вектор pGL3 перед репортерным геном люциферазы *Photinus pyralis*. Сравнили способность всех клонированных фрагментов ДНК направлять экспрессию гена люциферазы в серии из 7 опухолевых клеток, в нормальных фибробластах и кератиноцитах человека и одной линии опухолевых клеток мыши. Активность всех промоторов оказалась существенно выше в опухолевых клетках, чем в нормальных фибробластах и кератиноцитах. При этом специфичность промоторов в отношении опухолевых клеток снижалась в ряду PLK1, CKS1B, POLD1, MCM2, CDC6. Показано, что клонированный промотор гена CKS1B является двунаправленным и, по-видимому, направляет транскрипцию соседнего гена SHC1, ориентированного «голова к голове».

**Получение укороченных промоторов гена сурвивина человека (phSurv) и двойных тандемных промоторов, состоящих из модифицированных промоторов гена сурвивина человека (phSurv) и гена обратной транскриптазы теломеры человека (phTERT)**

Были проведены работы по получению коротких вариантов промотора сурвивина человека (399 и 269 п.о.) и получены конструкции, в которых репортерный ген находится под контролем этих промоторов. Проведено сравнение промоторных активностей PhSurv399, PhSurv269, полноразмерных промоторов сурвивина человека и мыши на 10 раковых и нормальных клеточных линиях различного происхождения. Показано, что промотор PhSurv269 обладает большей активностью, сохраняя при этом опухоль-специфичность. Были получены конструкции, несущие репортерный ген люциферазы светлячка под контролем двойных гибридных промоторов, состоящих из промотора PhTERT и PhSurv269: PhTert-PhSurv269 и PhSurv269-PhTert. В опытах по транзientной трансфекции 5 раковых и нормальных клеточных линий проведено сравнение активности и специфичности этих двойных промоторов с двойными гибридными промоторами PhTERT-PhSurv, PhSurv-PhTERT, PhTERT-PmSurv и промоторами PhTERT, PhSurv и PmSurv. Показано, что наибольшей активностью при сохранении опухоль-специфичности обладает двойной гибридный промотор PhTert-PhSurv269.

**Создание терапевтических векторов содержащих гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-tk) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) под контролем раковоспецифических и сильных промоторов и векторов с геном слитого белка цитозиндезаминазы- урацилфосфорилтрансферазы (CD) и геном GM-CSF.**

Для экспрессии суицидальных генов HSV-tk и CD в клетках меланомы были использованы меланомоспецифические промоторы и энхансеры генов, участвующих в биосинтезе меланина млекопитающих: гена *Tyr* мыши и гена *MIA* человека. Промоторы этих генов активны в меланоцитах и во многих меланомах и способны обеспечивать опухолеспецифическую экспрессию суицидальных генов в этих клетках. Для оценки силы этих промоторов использовали их влияние на экспрессию репортерного гена люциферазы. конструкции, несущие вдобавок к промоторам три энхансера гена *Tyr* мыши, которые, по литературным данным, усиливают активность промоторов *MIA* и *Tyr*. Было показано, что: (1) меланомные промоторы неактивны в клетках карциномы легкого человека (Calu1); (2) промотор гена *MIA* человека значительно более активен в клетках меланомы человека, чем в клетках меланомы мыши; (3) промотор гена *Tyr* мыши имеет слабо выраженную видоспецифичность; (4) энхансеры гена *Tyr* мыши сильно увеличивают активность промоторов в клетках меланомного происхождения вне зависимости от их видоспецифичности и не влияют на активность промоторов в немеланомных клетках; (5) активность меланомоспецифических промоторов в клеточных линиях A375, V16F1, M3 варьирует в пределах от 0.2 до 14% от активности промотора CMV.

Для оценки цитотоксических эффектов суицидальных генов был создан ряд генетических конструкций, состоящих из генов *CD* или *HSVtk* и гена *GM-CSF*, клонированных в экспрессионный вектор под контролем

сильных меланомо-специфических промоторов, и проведено исследование цитотоксического эффекта созданных конструкций в опухолевых клетках разного происхождения.

Впервые было показано, что для проявления цитотоксического эффекта суицидальных генов сила промотора не имеет решающего значения. Продемонстрировано, что цитотоксическая активность этих генов определяется количеством добавленного пролекарства.

#### **Качественное и количественное описание транскриптома *M. tuberculosis* в латентном состоянии (модель “некультивируемого” туберкулеза) и выходе из латентного состояния**

Проведено сравнение транскриптомов *M. tuberculosis* в модели дормантного состояния (состояние некультивируемости) и в логарифмической фазе роста. Полученные библиотеки кДНК были секвенированы на платформе Illumina. Для дормантного состояния была установлена нуклеотидная последовательность 4,5 млн мРНК и некодирующих РНК. Для логарифмической фазы роста была установлена последовательность 13 млн мРНК и некодирующих РНК. Глубина секвенирования позволила сравнить уровни экспрессии генов в этих двух модельных системах.

Показано общее снижение количества мРНК в дормантных клетках в 50-100 раз по сравнению с клетками в логарифмической фазе. При таком сильном снижении абсолютный уровень транскрипции всех генов оказывается ниже в дормантном состоянии. Выявлено, что при переходе в дормантное состояние понижается относительный уровень экспрессии генов, кодирующих белки рибосом, ферменты цикла трикарбоновых кислот, белки дыхательного комплекса и субъединицы F0F1 АТФ-синтазы, что свидетельствует о понижении уровня дыхания и синтеза новых рибосом. В дормантном состоянии повышается относительная экспрессия группы генов *re-pgfs*. Функции белков, кодируемых этими генами, достоверно неизвестны, однако имеются данные, что некоторые из этих белков участвуют в патогенезе *M. tuberculosis*. Найдена транскрипция нескольких некодирующих РНК в дормантном состоянии на чрезвычайно высоком уровне, превышающем уровень транскрипции белок-кодирующих генов.

#### **Сравнение последовательностей, транскрибирующихся у микобактерий при персистенции внутри нейтрофилов и макрофагов мыши**

Для проведения сравнительного исследования транскриптомов *M. tuberculosis* из двух различных микроокружений – внутриклеточных пространств нейтрофилов и макрофагов мышей - разработаны экспериментальные модели, позволяющие выделять макрофаги и нейтрофилы, содержащие фагоцитированные клетки патогена, из перитонеального пространства мыши. Эффективность разработанных методов выделения инфицированных фагоцитов (не содержащих примесей нефагоцитированных микобактерий) была подтверждена секвенированием по Сэнгеру библиотек кДНК; содержание микобактериальных транскриптов составляло не менее 50%.

Осуществлено массивное секвенирование транскриптомов *M. tuberculosis*, фагоцитированных нейтрофилами и макрофагами, объем секвенирования составил около  $2 \times 10^9$  нукл. Проведенный биоинформатический анализ показал, что при инфекции в нейтрофилах статистически достоверно повышена экспрессия генов *M. tuberculosis*, кодирующих белки MmpL4 мембранного кластера, регулона дормантности, а также модуля генов Proionate-CoA to Succinate. При инфекции в макрофагах статистически достоверно повышена экспрессия генов группы Biphenyl Degradation, оперона катаболизма холестерина и некоторых генов, вовлеченных в установление дормантного состояния.

#### **Изучение роли эпигенетических факторов в регуляции экспрессии генов *piw11***

Проведен анализ влияния метилирования CpG-богатых регуляторных участков генов *piw11* и *piw12* на их промоторную активность. В системе транзientной экспрессии репортерного гена показано, что метилирование CpG-островков существенно снижает их промоторную активность.

Проведено изучение влияния деметилирования на изменение уровня транскрипции генов *piw11* и *piw12* в клеточных линиях Tera1 и A549. Показано, что деметилирование CpG-островка оказывает влияние на транскрипцию гена *piw12* в клеточной линии Tera1. В других случаях деметилирование не вызывает реактивации транскрипции. Данные результаты указывают на высокую тканеспецифичность транскрипции обоих генов: деметилирование промоторной области является необходимым, но не достаточным условием для транскрипции.

Методом анализа кривых плавления (MCA) определен уровень метилирования CpG-островков гена *piw11* в парных образцах опухоли яичка и прилегающей нормальной ткани. Показана корреляция между увеличением метилирования CpG-островка, находящегося в первом интроне, и снижением уровня транскрипции в опухолевой ткани по сравнению с нормальной. Для CpG-островка, расположенного в первом, нетранслируемом экзоне, закономерности между метилированием и транскрипцией не найдено.

Методом MCA определен уровень метилирования CpG-островков гена *piw12* в парных образцах опухоли яичка и прилегающей нормальной ткани. Для исследуемых образцов определен уровень транскрипции гена *piw12*. Корреляции между метилированием и уровнем транскрипции не выявлено. Отсутствие выраженной эпигенетической регуляции транскрипции *piw12* при образовании опухоли яичка может быть связано с экспрессией изоформ мРНК с альтернативных промоторов.

#### **Поиск мишеней белков семейства PIWI методом хроматин-иммунопреципитации.**

Проведена работа по определению локализации коротких изоформ белка *piw12* в клетках линий Tera1 и NT2D1 иммуноокрашиванием клеток с помощью препаратов первичных и вторичных антител, полученные результаты оценивали с помощью конфокального микроскопа. Показано, что изоформа PL2L47 локализуется в клеточном ядре, а PL2L60 – в цитоплазме, что может определять их различную функциональную роль в процессах опухолеобразования. Методом иммунопреципитации обеих изоформ из клеточных линий Tera1 и

NT2D1 с помощью антител к изоформам нами показано, что короткие изоформы белка piwil2 комплексы не взаимодействуют с белком STAT3 (как было показано ранее), при этом цитоплазматическая изоформа PL2L60, в отличие от ядерной PL2L47, непосредственно взаимодействует с p53. Отработаны условия хроматин-иммунопреципитации для получения библиотек геномных фрагментов – потенциальных мишеней белков семейства PIWIL2.

**Проведение селекции регуляторов транскрипции и исследования их активности в нормальных и опухолевых клетках.**

Отработана методика получения представительных библиотек промоторов на основе лентивирусной системы экспрессии репортерного гена. Проведен подробный анализ функциональных свойств двунаправленного промотора, регулирующего активность генов *PSENFEN* и *U2AF1L4* в геноме человека. С помощью транзientной трансфекции культивируемых клеток линейаризованными плазмидами проанализирована энхансер-блокирующая активность потенциальных инсуляторов, среди которых стандартный инсулятор cHS4 из бета-глобинового локуса кур, а также ряд фрагментов, отобранных из генома человека на основании теоретического и экспериментального подходов.

## **Изучение механизмов регуляции экспрессии оперонов рибосомных белков у бактерий в нормальных и стрессовых условиях**

### **Лаборатория структуры и функции генов человека**

Исследована регуляция *in vivo* гена *grlY*, кодирующего 5S рРНК-связывающий рибосомный белок L25. Впервые показано, что ген регулируется и на транскрипционном и на трансляционном уровне. На уровне транскрипции синтез L25 подвержен строгому контролю (*stringent response*), в котором участвуют алармон *ppGpp* и транскрипционный фактор *DksA*. В ответ на аминокислотное голодание, промотор гена *grlY* снижает свою активность параллельно со снижением активности промоторов оперонов рРНК, что говорит о координированной регуляции экспрессии компонентов рибосомы в ответ на стресс. На уровне трансляции экспрессия *grlY* регулируется по механизму аутогенного контроля. Методами молекулярной генетики созданы специализированные штаммы, несущие в хромосоме слитый ген *grlY-lacZ*, экспрессия которого понижалась в присутствии плазмиды, экспрессирующей ген L25 *in trans*. Проведен филогенетический анализ регуляторных структур, отвечающих за уровень экспрессии *grlY* и его регуляцию. Выявлена консервативность специфических РНК-элементов в 5'-нетранслируемой области *grlY*-мРНК у 5 семейств гамма-протеобактерий, что предполагает сходство механизмов регуляции. Филогенетические предсказания подтверждены экспериментально. Участие консервативных РНК-элементов в регуляции экспрессии *grlY* доказано с помощью сайт-направленного мутагенеза. Показано также, что благодаря консервативности регуляторных структур ген *grlY* из *Yersenia pestis* регулируется белком L25 *E. coli*.

## **Структурная и функциональная геномика вирусов бактерий**

### **Лаборатория молекулярной биоинженерии**

1. Определены последовательности геномов бактериофагов PaBG, B8 *P. aeruginosa* и Fri1 *A. baumannii*. Особый интерес представляет собой гигантский фаг PaBG (GenBank accession NC\_022096.1), который не имеет существенной гомологии ни с одним из геномов фагов, представленных в GenBank .
2. Определены квазиатомные структуры белков хвостовых шипов и аппарата инъекции ДНК ряда бактериофагов (gp5.4 фага T4, gp164 фага phiKZ, gp27 фага 297, gp53 и 54 фага AP22, хвостового шипа-деполимеразы фага Fri1). Установлены полисахаридные субстраты для рецепторных деполимераз фагов *A. baumannii* Fri1 и AP22. Показано, что белки семейства PAAR образуют комплекс с тройной бета-спиральной иглой продукта гена 5 фага T4 и структурных ортологов *pg5* (*VgrG*) в составе VI системы секреции. Pg5.4, принадлежащий к этому семейству белков формирует острие, которым бактериофаг протыкает плазматическую мембрану клеток. Методом крио-электронной микроскопии показано, что в частице фага RB43, родственного T4, имеется неизвестный структурный ортолог *pg5.4* (при том, что гена, кодирующего белок 5.4 в геноме RB43 нет).
3. В сотрудничестве с институтом кристаллографии РАН продолжены исследования по изучению свойств шаперонина, кодируемого геном 146 бактериофага EL *P. aeruginosa*. Установлено, что фаговый шаперонин обладает АТФазной активностью. Изучено влияние различных факторов на АТФазную активность шаперонина
4. Сконструированы векторы экспрессии и получены более 20 рекомбинантных структурных и функциональных белков различных бактериофагов. Разрабатываются методы их очистки, проводятся физико-химические и энзимологические исследования.
5. Определены основные параметры ферментативной активности рекомбинантных пептидогликан-гидролаз бактериофагов PMG (*Pseudomonas*), 394 (*Salmonella*) и LysK (*Staphylococcus*). Проведены исследования влияния различных блок-полимеров на активность и спектр действия ферментов, опробовано их действие на клинические штаммы микроорганизмов.
6. Разработанная система ПЦР-типирования терапевтических бактериофагов псевдомонад и стафилококков была опробована на широкой выборке препаратов, промышленно выпускаемых НПО «Микроген». Было установлено, что эмпирические критерии подбора эффективности бактериофагов, применяемые на производстве, в целом соответствуют современным молекулярно-генетическим требованиям, а скрининг коллекций для выбора ранее неизвестных бактериофагов с помощью ПЦР-системы ускоряется в несколько раз.

7. Определены условия кристаллизации 4 белков, предназначенных для кристаллизации в условиях микрогравитации во время экспедиций МКС 35 - 37.

## **Исследование генетической составляющей социально-значимых заболеваний человека с помощью оригинальных тест-систем ДНК-диагностики**

### ***Лаборатория биотехнологии***

С помощью усовершенствованной системы ДНК-диагностики определен гаплотип M2 в гене аннексина A5 человека (гаплотип M2/ANXA5), ассоциированный с тромбофилиями и невынашиванием беременности у 11 пациентов Института Ревматологии РАМН. M2-гаплотип не выявлен ни у одного пациента. Проведены исследования статуса метилирования 5'-концевой области псевдогена опухолевого супрессора *PTENP1* у 105 больных гиперплазиями и раком эндометрия. Впервые обнаружено метилирование псевдогена более, чем у 50% больных, что указывает на выявление нового потенциального генетического маркера этого заболевания.

## **Структурно-функциональные исследования специфичных для человека изоформ hRPB11b $\beta$ и hRPB11c $\beta$ субъединицы РНК-полимеразы II POLR2J (hRPB11)**

### ***Лаборатория механизмов генной экспрессии***

С помощью генетического (дрожжевая двухгибридная система) и биохимического (соосаждение белков из клеточных лизатов) подходов осуществлён полномасштабный поиск белков-партнёров описанных нами ранее вариантов субъединицы РНК-полимеразы II человека hRPB11 – hRPB11b $\beta$ , hRPB11c $\beta$  – в протеоме человека (эмбриональный мозг и клеточная линия Jurkat). В результате определён основной спектр белковых партнёров этих специфичных для человека изоформ субъединицы РНК-полимеразы II hRPB11 (POLR2J). Среди белков-партнёров сходных между собой изоформ hRPB11b $\beta$  и hRPB11c $\beta$  (116 а.о.) нами обнаружены субъединица РНК-полимеразы II hRPB6, новый, ранее не описанный вариант ядерной рибонуклеазы III DROSHA (RNASEN), кóровый компонент белкового комплекса экзонных сочленений EJC (exon-exon junction complex) Y14 (RBM8A), а также белки DCAF, EIF6 и RPS3A. Наличие в этом списке особого варианта иницирующей нуклеазы процессинга микроРНК (miRNAs) DROSHA и участвующих в биогенезе и регуляции функционирования siRNAs белков EIF6, RPS3A и DCAF указывает на новый тип сопряжения процессов транскрипции и РНК-интерференции у *Homo sapiens*.

## **Трансген-индуцированная модификация фенотипа растительных и животных клеток и организмов для фундаментальных исследований и применения в биотехнологии**

### ***Лаборатория биотехнологии растений***

Получен рекомбинантный бинарный вектор pBIAGUS1 с геном антимикробного пептида бомбина (*bom*), с помощью которого проведена агробактериальная трансформация растений табака и рапса. Присутствие гена *bom* в геноме растений подтверждено методом ПЦР. Экспрессия гена *bom* в трансгенных растениях показана по ингибированию роста фитопатогенных бактерий *Erwinia carotovora* экстрактами трансформированных растений.

Получены трансгенные растения камелины (*Camelina sativa* (L.) Crantz), рапса масличного (*Brassica napus* L.) и каланхоэ перистого (*Kalanchoe pinnata* L.) с искусственным геном антимикробного пептида цекропина P1 (*cecP1*). Агробактериальная трансформация проведена с использованием бинарных векторов pGA482::*cecP1* и pBM::*cecP1* методом вакуумной инфильтрации. Присутствие гена *cecP1* в геноме растений подтверждено методом ПЦР. Экспрессия гена *cecP1* в трансгенных растениях показана вестерн-блот анализом и по антимикробной активности растительных экстрактов по отношению к бактериальному фитопатогену *Erwinia carotovora*. Растения поколения F<sub>0</sub> и F<sub>1</sub> имели нормальный фенотип и сохраняли способность образовывать при самоопылении жизнеспособные семена. *CecP1*-растения проявляли повышенную устойчивость к бактериальным и грибным фитопатогенам: *Erwinia carotovora*, *Sclerotinia sclerotiorum* и *Fusarium sporotrichioides*. Установлено меньшее снижение скорости фотосинтеза у цекропин P1-экспрессирующих растений в условиях заражения. Показана повышенная устойчивость *cecP1*-растений к солевому стрессу и к окислительному стрессу, вызванному действием гербицида параквата. Полученные результаты указывают на возможность включения гена цекропина P1 в интегральную антистрессовую защитную систему растений.

Исследованы микробиологические подходы для создания растительно-микробного комплекса с устойчивостью к стресс-факторам. Объектом исследования являлись стерильные растения томата (*Lycopersicon esculentum*) и табака (*Nicotiana glauca*). Растения колонизировали бактериальными штаммами *Methylovorus mayis* ВКМ В-2221, *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393, *Pseudomonas putida* BS 3701, *Acinetobacter baumannii* 7, *Rhodococcus erythropolis* S67. Показана стабильная колонизация растений исследуемыми бактериями. Колонизированные растения обладали повышенной устойчивостью к биотическим (фитопатогены) и абиотическим (гербицид паракват и нафталин) стресс-факторам. Определена активность ферментов антиоксидантной системы растений (супероксиддисмутазы, каталазы), уровень перекиси водорода и перекисного окисления липидов. Результаты исследования показали, что колонизированные растения обладают большей устойчивостью к окислительному стрессу, о чем свидетельствовал анализ активности ферментов-антиоксидантов.

Получены и проанализированы растения табака с геном стилибенсинтазы *vinst1* винограда *Vitis vinifera* (GenBank AB046375.1). Этот ген встраивали в вектор для трансформации растений pSS под контроль сильного конститутивного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты CaMV 35SS. Полученными рекомбинантными плазмидами трансформировали штаммы агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* CBE21 и A281(pTiBo542). Эти агробактерии использовали для трансформации листовых эксплантов растений и инфильтрации семян. Показано наличие гена *vinst1* в ДНК нескольких линий трансгенных растений табака. Проведено тестирование полученных растений на устойчивость к фитопатогенам. Показана устойчивость листьев отдельных линий растений к ряду фитопатогенных бактерий и грибов. Планируется получение безмаркерных растений с геном стилибенсинтазы и их отбор с помощью новых разрабатываемых нами биотестов.

Проведен анализ количества копий и наследования гена *hmg1* в семенах трансгенных растений табака с различными формами гена *hmg1* после самоопыления и в результате анализирующего скрещивания с растениями дикого типа. Продемонстрировано наличие трансгенных линий табака с одной, двумя и более копиями гена *hmg1*. Обнаружено замолкание маркерного гена *nptII* в процессе длительного культивирования трансгенных растений линии С2 с несколькими копиями встроенного гена *hmg1* на селективной среде в условиях *in vitro*.

Выявлены изменения в формировании арбускулярной микоризы у трансформантов табака. Линии растений с дополнительной копией гетерологичного гена *hmg1* отличались большей степенью развития микоризы (арбускул и везикул на их корнях увеличилось в 2 и в 5 раз, соответственно), тогда как у трансформантов с антисмысловой копией встроенного гена *hmg1* существенным (в 4 раза) было уменьшение частоты встречаемости арбускул. Обнаружены изменения в содержании суммы стеринов листьев у трансгенных линий табака. До цветения растений листья смысловых линий содержали стеринов больше (в 1.5 раза), чем в контроле. Снижение количества стеринов (на 20%) в листьях антисмысловых линий трансгенных растений табака по сравнению с контролем наблюдалось во время цветения. Мезоструктурный анализ листа контрольных и трансгенных растений табака с модифицированной экспрессией гена *hmg1* выявил увеличение количества хлоропластов на единицу площади у всех трансгенных линий растений по сравнению с контролем. Наиболее заметное увеличение наблюдалось у линий с антисмысловой формой встроенного гена *hmg1*. В результате структурной перестройки листа происходила тенденция к снижению ассимиляционного числа, особенно у растений «антисмысловых» линий табака. Изучение морфометрических показателей проростков табака выявило, что ингибирование экспрессии гена *hmg1* в растениях с антисмысловой формой гена приводило к снижению уровня эндогенных цитокининов в семенах этих линий трансгенных растений.

Проведено исследование стресс-толерантности трансгенных растений табака с геном *hmg1* к влиянию избытка ионов меди на разных этапах онтогенеза растений. Выявлены наиболее удобные маркеры для характеристики данного стрессора как на самых ранних этапах воздействия, так и при более длительных экспозициях. Трансгенные растения со смысловой формой гена *hmg1* показали меньшее развитие стресса в ответ на действие высоких доз ионов меди, чем растения дикого типа. Растения с подавленной экспрессией гена *hmg1*, наоборот, были более восприимчивы к действию ионов меди. Получены приоритетные данные о том, что трансгенные линии растений накапливают большее количество меди, чем контрольные. Обнаруженные различия в аккумулялирующей способности и стресс-толерантности трансгенных растений с геном *hmg1* свидетельствуют о перспективе использования таких растений для фиторемедиации почв, загрязненных соединениями меди.

Для изучения трансген-индуцированного метилирования генома эукариотических клеток с помощью модифицированных форм цитозинового ДНК-метилтрансфераз с различной специфичностью получена генетическая конструкция с использованием генов зеленого флуоресцентного белка GFP и бактериальной ДНК-метилтрансферазы *HhaI*, модифицированных специфическими последовательностями, кодирующими транспортные пептиды для переноса белка через клеточную мембрану и в ядро эукариотических клеток. Полученный белок экспрессирован в *E. coli*, выделен и очищен до гомогенного состояния. Функциональная активность модифицированного белка подтверждена экспериментально в условиях *in vivo*. Данный белок успешно проникал в ядра культивируемых клеток эмбрионального почечного эпителия человека HEK293, что было подтверждено наблюдением трансфицированных клеток с помощью флуоресцентной микроскопии, в том числе и в конфокальном режиме наблюдения. Проводится молекулярно-биологический анализ трансфицированных клеток.

Для исследования хроматин-зависимого метилирования эукариотического генома создана генетическая конструкция, содержащая ген эукариотической хромометилазы под контролем промотора цитомегаловируса. Полученной конструкцией проведена трансфекция клеток HEK293, отобраны стабильные клеточные линии, экспрессирующие ген хромометилазы.

**Изучение молекулярно-биологических механизмов и разработка методов молекулярной селекции для получения растений с/х культур, устойчивых к стрессовым факторам внешней среды и с улучшенным качеством урожая**  
**Лаборатория экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон)**

Для переноса в геном растений последовательности генов наиболее вредоносного вируса Шарки сливы (PPV) и наиболее распространенного возбудителя вирусного заболевания хризантемы – вируса В (CVB), была выбрана последовательность 3'-концевого района геномной РНК полноразмерного гена белка оболочки. Для

этого произведено клонирование фрагментов геномов вирусов В хризантем (CVB) и Шарки сливы (PPV) и созданы векторные конструкции содержащие следующие кассеты экспрессии: с геном белка оболочки вируса В (CVB) хризантемы в прямой и обратной ориентации, с двойной последовательностью белка оболочки вируса В в прямой ориентации, РНКи конструкция с геном белка оболочки В вируса хризантемы (CP CVB), с геном белка оболочки вируса Шарки сливы (PPV) в прямой ориентации что позволит изучить механизмы устойчивости растений к вирусной инфекции и возможности молекулярно-генетических приемов создания растения с различной степенью устойчивости к фитовирусам.

Проведен сравнительный анализ морфогенетического потенциала 5 сортов яровой твердой пшеницы, 21 сорта яровой мягкой пшеницы и 6 сортов озимой мягкой пшеницы российской селекции. Полученные экспериментальные данные позволили разработать методику эффективного соматического эмбриогенеза (25-97%) и регенерации растений (2.3-18.4 побегов/эксплант) путем модификации гормонального и углеводного состава питательных сред применительно к сортам российской селекции, проанализировать эффективность культуры *in vitro* озимых и яровых сортов и отобрать шесть генотипов (Андрос, Лада, Норис, Таежная, Энита, Крошка) для дальнейших исследований.

Проведен анализ известных на сегодняшний день плодоспецифичных промоторов томата, и выбран оптимальный для экспрессии как гетерологичных, так и гомологичных последовательностей в плодах томата. С геномной ДНК гибридной линии томата Ялф амплифицированы два варианта последовательностей промотора полигалактуроназы с разным набором мотивов регуляции. Первая – полная последовательность полигалактуроназного промотора, размером 1400 п.о. со всеми мотивами регуляции экспрессии. Вторая – укороченная, размером 1150 п. о., в которой отсутствует мотив негативной регуляции. Полная последовательность промотора контролирует экспрессию строго в созревающих плодах, укороченная - направляет экспрессию гена как во внешний, так и во внутренний перикарп плода, а также во всех тканях созревающего плода. Полная последовательность промотора, будет обеспечивать строгую плодоспецифичную экспрессию интересующего гена, и ее можно будет использовать при модификации процессов созревания, когда экспрессия чужеродной последовательности в других тканях нежелательна. Предполагается, что укороченная форма будет обеспечивать менее специфичную экспрессию в плодах, но уровень ее будет достаточно высок во всех тканях плода, поэтому ее можно будет использовать для экспрессии в плодах томата генов, обеспечивающих синтез веществ, повышающих диетические качества плодов и т. п.

## **Молекулярные механизмы клеточной дифференцировки, иммунитета и онкогенеза (59)**

### **Исследование механизмов опухолевой прогрессии Инновационный центр Технопарк ИБХ**

Собрана коллекция биологических образцов пациентов с доброкачественными и злокачественными опухолями толстого кишечника (аденомы и аденокарциномы), кожи и слизистых (меланоцитарные невусы и злокачественные меланомы) и щитовидной железы (фолликулярные аденомы и дифференцированный рак). Образцы от каждого пациента включают в себя опухолевую и нормальную ткань (край резекции), а также плазму и клетки крови. Сбор материала осуществлялся в соответствии со специально разработанными стандартными операционными процедурами, обеспечивающими максимальную сохранность целевых анализов, включая циркулирующие внеклеточные ДНК и РНК, и их доступность для последующего анализа. Параллельно с коллекцией биологических образцов была создана база клинических данных.

Отработаны методические приемы выделения циркулирующей внеклеточной ДНК из плазмы крови. Путем оптимизации концентраций протеолитического фермента и хаотропных агентов, а также РНК-носителя, удалось увеличить выход ДНК более чем в 100 раз по сравнению со специализированными наборами реагентов для выделения внеклеточных ДНК на основе колонок (Macherey-Nagel, БиоСилика) и магнитных шариков (Roche, Изоген). Средняя концентрация внеклеточной ДНК, выделенной разработанным методом, составляет 4,6 нг/мл плазмы.

Усовершенствованы технологии ПЦР-анализа минорных мутаций. Основной причиной ограниченной избирательности разработанных нами ранее техник мутационно-специфической ПЦР являются артефактные точечные мутации. Удалось установить, что подавляющее большинство артефактных мутаций приходится на транзиции С-Т и что существенный вклад в пул этих транзиций вносят два фактора - дезаминирование цитозина в урацил по влиянием высокой температуры и мисинкорпорация G - Т вследствие wobble-эффекта. Сочетание технологических приемов, противодействующих данным факторам (использование смеси ДНК-полимераз, одна из которых обладает 3-5-экзонуклеазной активностью и лишена мутаций толерантности к dU; использование дезокси-2-тиотимидинтрифосфата вместо дезокситимидинтрифосфата), позволило увеличить избирательность мутационного анализа до 1 : 1 000 и выше, что открывает дорогу для новых практических применений в области молекулярной онкодиагностики.

Количественный и качественный анализ ДНК образцов из собранной коллекции показал, что: а) концентрации внеклеточной ДНК в плазме крови у пациентов с доброкачественными и злокачественными опухолями существенно не отличаются; б) у пациентов всех групп концентрация внеклеточной ДНК в плазме

крови существенно выше после оперативного вмешательства, причем степень повышения концентрации ДНК коррелирует с силой послеоперационного воспаления.

Была разработана технология сравнительного анализа транскриптомов опухолевых образцов из парафиновых блоков на основе массивированного параллельного секвенирования, включающая синтез первой цепи кДНК с рассеянной заправкой и последующую деплецию рибосомальной и транспортной РНК с использованием дуплекс-специфической нуклеазы из гепатопанкреаса камчатского краба. Показано существенное увеличение детектирующей способности такого анализа в плане выявления точечных мутаций и редких транскриптов и пренебрежимый уровень искажений транскрипционного профиля (измеренный уровень цифровой экспрессии мРНК в RPKM отличался от такового в недеплецированной РНК в среднем менее чем на 0,1%).

С помощью данной технологии был выполнен сравнительный анализ транскриптома опухоли толстой кишки, синхронного метастаза в забрюшинный лимфоузел и метастаза в верхнюю челюсть, возникшего после полихимиотерапии с применением антиангиогенного препарата бевацизумаб (Авастин). Выявлен ряд дифференциально экспрессированных кандидатных маркеров - мРНК генов молекул адгезии, металлопротеиназ, хемокинов и хемокиновых рецепторов - потенциально связанных с формированием устойчивости к антиангиогенным препаратам и со склонностью к метастазированию в «экзотические» для колоректального рака органы и ткани. Предиктивная значимость данных маркеров будет проверена нами в проспективном сравнительном исследовании в 2014-2015 гг.

На материале злокачественных опухолей различной локализации исследованы разные аспекты «зависимости от онкогенов». На когорте образцов колоректального рака с «благоприятными» и «неблагоприятными» мутациями в гене *K-Ras* нами впервые показано, что различная прогностическая значимость двух типов мутаций опосредована ассоциированностью «благоприятных» мутаций с гиперметилированием нескольких генов-супрессоров, известным под названием «гиперметилированного фенотипа» и обладающим достоверным благоприятным влиянием на прогноз. Аналогичная ассоциация между «гиперметилированным фенотипом» и специфическими мутациями в протоонкогене была прослежена нами и на материале злокачественных глиом (в данном случае наблюдалась ассоциация с мутациями в гене *IDH1*, уже описанная в литературе). При этом удалось выяснить, что в обоих типах злокачественных опухолей «гиперметилированный фенотип» включал в себя инактивацию гена *SMAD1*, описанную при фолликулярных лимфомах и являющуюся маркером чувствительности лимфомных клеток к эпигенетической терапии; данный факт может стать основой для разработки нового подхода к лекарственному лечению опухолей толстой кишки и злокачественных глиом.

На подборке образцов опухолевой ткани пациентов с недифференцированными плеоморфными саркомами мы показали, что: 1) для данного типа опухолей характерна одновременная активация нескольких протоонкогенов; 2) в ряде случаев одним из активированных протоонкогенов оказывается ген *B-Raf*, что открывает возможности для таргетной терапии данного типа сарком; 3) уровень экспрессии мРНК генов метаболизма пиримидинов, потенциально интересный как предиктивный маркер при терапии 5-фторурацилом, может также быть использован как маркер для уточнения классификации данного типа опухоли по гистологическим подтипам. Кроме того, в образце плеоморфной миксофибросаркомы нами была обнаружена не описанная ранее в литературе активирующая мутация Gly227Lys в протоонкогене *GNAS*.

На подборке образцов опухолевой ткани пациентов с увеальными меланомами мы показали, что мутационный профиль данной опухоли в российской популяции не отличается от европейской и американской по набору активированных протоонкогенов, однако отличается от них по частоте встречаемости мутаций - в российской популяции преобладают мутации в гене *GNA11*.

На материале молекулярного анализа и клинических данных по пациентам с немелкоклеточным раком легкого и злокачественными глиомами, получавшим терапию ингибиторами *EGFR*, показано принципиальное значение комплексных генетических нарушений в поддержании гомеостаза опухолевых клеток. В обоих случаях активирующие мутации возникают на фоне увеличения копийности и коротких делеций и инверсий в соответствующем локусе и никогда не появляются во всех копиях протоонкогена. С помощью цитогенетических методов показано преимущественное расположение дополнительных, в том числе мутантных, копий протоонкогена в коротких экстрахромосомных фрагментах ДНК. Преимущественным механизмом формирования устойчивости к ингибиторам белка *EGFR* в данных опухолях оказывалась дополнительная перестройка локуса (появление дополнительных мутаций, утрата мутантного аллеля и утрата дополнительных копий гена *Lancl2*, чей белковый продукт ингибирует экспрессию генов множественной лекарственной устойчивости). Таким образом, мы показали тенденцию к сохранению в устойчивых опухолях «зависимости» от активации *EGFR* и высокую пластичность данного локуса, что в сочетании с данными о слабой жизнеспособности опухолевых клеток с устойчивыми аллелями открывает возможность для разработки прерывистой таргетной терапии как стратегии «длительного сдерживания» роста опухоли.

## **Механизмы иммуномодулирующего действия эндогенных стресс-индуцируемых протеинов и новые подходы к коррекции иммунного ответа** **Лаборатория клеточных взаимодействий**

Первая часть исследований отчетного периода была связана с изучением процесса формирования внеклеточного пула БТШ70, обладающего выраженными иммуномодулирующими свойствами, а также с

анализом иммуномодулирующих эффектов внеклеточных БТШ70. В настоящее время достаточно подробно охарактеризовано активирующее действие экзогенных белков теплового шока, в частности БТШ70, на антигенпредставляющие клетки. Кроме этого, накопленные данные указывают на то, что внеклеточный пул БТШ70 вовлечен и в другие иммунные процессы. Причем клетки иммунной системы могут являться не только мишенями для этих протеинов, но и источником внеклеточных БТШ70. Способность клеток иммунной системы синтезировать белки теплового шока в неблагоприятных условиях является важным показателем их функционального состояния. При анализе изменения содержания БТШ70 в нейтрофилах периферической крови человека в ответ на тепловой шок нами было обнаружено быстрое увеличение внутриклеточной концентрации этого протеина сразу после тепловой обработки и ее последующее снижение через 15 мин после завершения термического воздействия, что, вероятнее всего, обусловлено выбросом БТШ70 во внеклеточное пространство. Большинство исследователей связывают феномен стресс-индуцированного экзоцитоза БТШ70 с высвобождением в окружающую среду индуцируемой, но не конститутивной формы этого протеина. Однако мы установили, что обработка клеток ингибитором АВС-транспортёров, блокирующего секрецию внутриклеточных протеинов в составе эндолизосом, приводила к исчезновению фазы снижения содержания БТШ70 в нейтрофилах за счет сохранения во внутриклеточном пространстве конститутивной формы этого белка. Полученные данные свидетельствуют о функционировании в нейтрофилах пути стресс-индуцируемого высвобождения конститутивной формы БТШ70 в секреторных эндолизосомах. Проведенные нами исследования продемонстрировали также способность различных популяций лимфоидных клеток формировать внеклеточный пул БТШ70, содержащий как индуцируемую, так и конститутивную разновидности этого протеина. Одним из механизмов формирования такого пула связан с продукцией клетками экзосом, содержащих в своем составе БТШ70. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что экзоцитоз БТШ70 в популяциях лимфоцитов является не только стресс-индуцированным, но и нормальным физиологическим процессом. Это позволяет сделать предположение о вовлеченности циркулирующих эндогенных внеклеточных БТШ70 в процессы иммунорегуляции.

Во второй части исследований, посвященных изучению механизмов иммуномодулирующих эффектов молекулярных конструкций, содержащих миелопептиды, было продемонстрировано выраженное иммуностимулирующее действие миелопептидов МП-1, МП-3 и МП-5, совместно размещенных на полимерной молекуле-носителе. Указанная конструкция существенно увеличивала продукцию интерферона-гамма клетками иммунной системы и уровень экспрессии рецепторов, активирующих эффекторы врожденного иммунитета. Так, в экспериментах с лейкоцитами, выделенными из периферической крови человека, было установлено, что полученный нами конъюгат миелопептидов МП-1, МП-3 и МП-5 с молекулой полилизина обладает иммуностимулирующим действием, достоверно превышающем таковой, зарегистрированный у использованных миелопептидов, у их суммы, у носителя и у смеси миелопептидов с носителем. Об иммуностимулирующем эффекте созданной конструкции свидетельствовала выраженная индукция этим препаратом синтеза и секреции интерферона-гамма в культуре мононуклеаров периферической крови, а также значительное усиление уровня экспрессии моноцитами и нейтрофилами рецепторов TLR-2 и TLR-4.

Существенные результаты были получены при анализе механизмов развития гипериммунных реакций в мышинной модели аллергии. В частности, в наших экспериментах была определена концентрация внеклеточного БТШ70 в лаважных бронхоальвеолярных смывах мышей на различных стадиях аллергического воспаления дыхательных путей. Было проведено сравнение соотношений АТФ/БТШ70 в норме и при воспалении, что позволило выявить значительное снижение этого соотношения в острой фазе воспалительного процесса. Ранее нами было обнаружено, что интрафарингеальное введение БТШ70 мышам с индуцированным аллергическим воспалением дыхательных путей повышало уровень нейтрофилов в бронхоальвеолярных лаважах мышей. Поскольку источником нейтрофилов на периферии являются предшественники, локализующиеся в костном мозге, нами было проведено определение активности нейтрофилов костного мозга на различных стадиях аллергического воспаления дыхательных путей. Было показано, что трансмиграция нейтрофилов на периферию коррелирует с активностью, но не с процентом нейтрофилов костного мозга. Ингаляция БТШ70 повышала у мышей активность и способность к трансмиграции нейтрофилов костного мозга, что объясняло наблюдаемое увеличение количества нейтрофилов в бронхоальвеолярных смывах. Были получены данные, свидетельствующие в пользу гипотезы об участии БТШ70 в регуляции воспалительных процессов путем связывания внеклеточного АТФ. Было показано, что в присутствии АТФ значительно снижался хемотактический эффект, оказываемый этими молекулами на дендритные клетки.

## **Исследование молекулярных механизмов канцерогенеза в клетках органов малого таза человека**

### ***Группа геномного анализа сигнальных систем клетки***

В результате выполнения работ, была получена информация по aberrантно регулируемым внутриклеточным сигнальным путям в тканях рака мочевого пузыря человека, исследован вклад метилирования генов и экспрессии коротких РНК в наблюдаемый профиль измененной активности сигнальных путей.

## **Ганглиозид-опосредованные сигнальные пути в нормальных и опухолевых иммунных клетках**

### ***Группа липидных модуляторов иммунитета***

Коммерческие моноклональные антитела (14G2a) перекрестно реагируют с молекулами адгезии ALCAM, что затрудняет их использование для анализа как контактирующих с онкоассоциированным ганглиозидом GD2 белков, так и сигнальных путей, конститутивно активированных в GD2-позитивных опухолевых клетках. Поэтому нами был разработан и применен новый способ получения мАт против GD2 (анти-GD2-мАт) для получения высокоспецифических мАт с различной аффинностью. В качестве антигена были использованы ганглиозид-мимикрирующие пептиды, а также их модифицированные аналоги. Получена панель стабильных гибридных клонов, продуцирующих анти-GD2-мАт.

Показано, что в плазматической мембране клеток Т-лимфомы EL-4 ганглиозид GD2 контактирует с интегрином- $\beta$  и не взаимодействует с рецептором смерти CD95.

Проведен анализ температурных зависимостей эффективности переноса энергии (E) при индуктивно-резонансном переносе энергии (пары: AV-SM/Per-PC и AV-SM/Per-GM1, донором служит антрилвинилмеченый (AV) зонд, а акцептором – периленоилмеченый (Per)) от концентрации ганглиозида GM1. Полученные зависимости позволили охарактеризовать локализацию ганглиозида в липосомах, сформированных из трехкомпонентной рафтообразующей смеси липидов. При переходе GM1 из неупорядоченных в жидко-упорядоченные домены ганглиозид, по-видимому, локализуется на границе раздела фаз, что приводит к появлению дополнительного перегиба кривых при 23°C в паре AV-SM/Per-GM1, отсутствующего в паре AV-SM/Per-PC.

## **Исследование роли белка YB-1 в реакциях врожденного иммунитета**

### ***Лаборатория иммунохимии ФИБХ***

Иммуногенными пептидами белка NOD 2, подобранными с помощью набора программ Sequilab (<http://www.sequilab.org>): KANGLAAFLQHVRE K15E KAEPHNLQIT K10T были иммунизированы кролики по следующей схеме: иммунизация конъюгатами пептидов с BSA, 3 иммунизации конъюгатами с ova с недельным интервалом. Далее определяли титр свывороток по отношению к конъюгату с BSA и самому BSA. Антитела выделяли с помощью иммуноаффинной хроматографии на колонке с пептидами, иммобилизованными на эпокси-активированной сефарозе. Для исследования колокализации YB-1 и NOD2 использовали копреципитацию. Лизат клеток моноцитарной линии WEHI 3 инкубировали с биотинилированными антителами против YB-1, образовавшиеся комплексы адсорбировали на магнитных частицах со стрептавидином, элюировали буфером с pH 2,3 и анализировали с помощью иммуноблоттинга. Детекцию осуществляли с помощью поликлональных антител против пептидов NOD2. Было показано, что YB-1 и NOD2 образуют внутриклеточный комплекс, причём его образование зависит от концентрации ГМДП.

## **Изучение функции опухолевого супрессора PDLIM4/RIL**

### ***Группы ЭБФРД***

Для установления возможности классификации опухолей молочной железы по уровню экспрессии гена PDLIM4/RIL мы предприняли глубокое секвенирование транскриптомы из четырех линий клеток, характеризующихся нормальным уровнем экспрессии (линии MDA MB231, MDA-MB435S, BT474, SK-BR3) и подавлением экспрессии (линии MCF7, BT20, T47D, MDA-MB468). Из перечисленных линий клеток выделяли препараты РНК, готовили кДНК и подвергали глубокому секвенированию на секвенаторе Illumina 2500 (Hi-Seq). Сравнение результатов секвенирования клеточных линий рака молочной железы с контролем (нормальным эпителием) производилось как попарно, для каждой линии и контроля, так и в группах. В случае попарного сравнения, результаты двух независимых секвенирований двух независимо полученных образцов кДНК для каждой клеточной линии объединялись, и сравнивались с аналогичным образом объединенными данными, полученными при секвенировании образцов контрольных культур. Для проведения группового сравнения, результаты секвенирования клеточных линий были объединены в две группы, в соответствии со статусом гена PDLIM4/RIL, который был определен ранее методами ОТ-ПЦР и вестерн-блоттинга. Результаты объединения групп, включающие в себя объединения всех повторностей, сделанных для каждой клеточной линии, также сравнивались с контрольной группой, включающей в себя все повторности секвенирования контрольной культуры. В качестве внутреннего параметра, характеризующего изменения транскрипции, использовали частоту встречаемости последовательности кДНК гена PDLIM4/RIL. Во всех образцах наблюдалась отличная корреляция этого параметра с известными уровнями экспрессии этого гена. Практически во всех линиях клеток, характеризовавшихся супрессией гена частота его транскриптов была снижена на три порядка.

Списки дифференциально экспрессирующихся генов между группой PDLIM4- и контролем, и между группой PDLIM4+ и контролем, анализировались на предмет наличия генов, экспрессия которых изменяется сходным образом в обеих группах, после чего такие гены исключались.

В результате были получены два списка дифференциально экспрессирующихся генов – для PDLIM4- и PDLIM4+ групп образцов, содержащие только гены, уникальные для данной группы. Наибольший интерес в данном случае вызывает список генов, характерных для PDLIM4- группы. Этот список обширен и включает в себя более 1700 генов, экспрессия которых изменилась более чем в 2 раза, причем ряд транскриптов либо полностью подавлен (не обнаружено ни одной копии мРНК), либо уникален для этой группы образцов (не обнаружено ни одной копии мРНК в группе контрольных образцов). В этом списке был произведен поиск генов, имеющих отношение к опухолевой трансформации, фенотипическим изменениям, эпителиально-мезенхимальной транзиции и регуляции активности тирозиновых киназ (белков, ассоциированных с тирозиновыми киназам, собственно тирозиновых киназ и тирозиновых фосфатаз). Отдельный интерес вызывали тирозиновые киназы семейства Src, активность которых может регулироваться белком PDLIM4/RIL.

Наиболее характерные изменяющиеся гены были отобраны для постановки количественного ПЦР теста с целью последующего анализа клинических образцов рака молочной железы. Для них получены праймеры и отработаны режимы детекции.

В настоящее время ведется анализ списка дифференциально-экспрессирующихся генов с целью построения рабочих гипотез, подлежащих экспериментальной проверке на следующих этапах работы. Получены также линии клеток каждой их групп, в которых ген PDLIM4/RIL либо подавлен РНК-интерференцией, либо восстановлен за счет гиперэкспрессии рекомбинантной конструкции. РНК из этих сублиний будут подвергнуты глубокому секвенированию на следующем этапе.

### **Специфическое нацеливание терапевтических вирусов с помощью рекомбинантных наноантител. Группы ЭБФРД**

Работа имеет целью создание более специфичных и эффективных онколитических вирусов, способных с высокой точностью распознавать и уничтожать раковые клетки. Предполагается проведение нацеливания вирусов на специфическую мишень, характерную для многих типов эпителиальных раков – экстрацеллюлярный домен белка CD47, с тем чтобы он стал рецептором для таких вирусов. Для этого планируется получение одноцепочечных антител к этому домену, получение кДНК клона таких антител, конструирование наноантител на основе антиген-связывающего домена, введение этого домена в состав поверхностного белка вируса. Альпаки, наряду с другими представителями камелид, образуют антитела, специфичность которых определяется исключительно тяжелой цепью иммуноглобулина. Поэтому эти животные особенно интересны для получения кДНК клонов, кодирующих специфические антитела в составе единственной полипептидной цепи.

В рамках этой работы на первом этапе была создана экспрессирующая конструкция для экстрацеллюлярного домена белка CD47, получена линия клеток, секретирующая высокие уровни этого белка (около 1 мкг на мл среды), наработан белок и использован для иммунизации альпаки. Проведено четыре цикла иммунизации, подкожно, с использованием адьюванта. Далее титр антител был определен серологически. Из периферической крови иммунизированной альпаки получены периферические лейкоциты, из которых выделена РНК и проведена амплификация переменного домена иммуноглобулина. Полученная кДНК использована для создания клонотек кДНК, содержащей последовательности антител в составе фагамиды. С помощью процедуры паннинга произведено обогащение фагов частицами, экспрессирующими на поверхности белки, обладающие аффинностью к белку CD47. Проведено секвенирование клонов и определено, что имеется по крайней мере три типа наноантител, специфичных для белка CD47. Эти клоны будут использованы на последующих этапах для введения домена, связывающего белок CD47 в состав онколитических вирусов, что повысит их специфичность в отношении раковых клеток.

## **Биофизика, радиобиология, математические модели в биологии, биоинформатика (61)**

### **Молекулярное моделирование структуры, динамики, функции биомолекулярных систем**

#### *Лаборатория моделирования биомолекулярных систем*

#### **1. Молекулярные основы селективного действия биоактивных пептидов и рациональный дизайн высокоаффинных аналогов таких пептидов при помощи метода «Белковой топографии»**

1) Разработан метод «Белковой топографии», впервые примененный к семейству  $\alpha$ -нейротоксинов из яда скорпионов и позволивший выявить молекулярные детерминанты селективного действия этих токсинов на потенциал-чувствительные натриевые каналы насекомых и/или млекопитающих. Подробно проанализирована применимость этого метода и усовершенствованы некоторые его особенности, касающиеся сферической

проекции физико-химических свойств, распределенных на молекулярной поверхности пептидов и их интерполяции для представления данных в регулярной форме. Усовершенствованный вариант позволяет уменьшать искажения, вносимые в данные в процессе проецирования на сферу. 2) Проведен молекулярно-динамический и функциональный анализ 39  $\alpha$ -конотоксинов из семейства 4/7, проявляющих ингибирующую активность в отношении  $\alpha_7$ -ацетилхолиновых рецепторов (АХР). Построение усредненных по равновесному участку траектории молекулярной динамики (МД) карт электростатического потенциала и кластерный анализ позволили выявить детерминанты поверхности токсинов, отвечающие за высокое сродство к АХР, и предложить возможные благоприятные (увеличивающие сродство в АХР) и неблагоприятные (наоборот) замены. Некоторые аналоги конотоксина PnIA с предположительно увеличенным сродством синтезируются в Отделе молекулярных основ нейросигнализации для биохимической проверки. 3) Способность метода белковой топографии выявлять структурные детерминанты селективного действия биоактивных пептидов проверяется на наборе нейротоксинов из ядов скорпионов, селективно блокирующих пору в потенциал-чувствительных калиевых каналах  $K_v1.1-1.3$ . Сформирована база данных по таким токсинам с установленной ингибирующей активностью к каждому из подтипов каналов, проведены расчеты МД для набора >20 токсинов в явно заданном растворителе – с целью построения усредненных по равновесному участку траектории МД карт молекулярного гидрофобного потенциала и электростатического потенциала. Ведется анализ полученных данных, который позволит выявить характерные особенности пептидов, селективно связывающихся с каждым из подтипов  $K_v$ .

### ***2. Молекулярное моделирование взаимодействия ТМ спиралей (ТМС) белков: Конформационная динамика димеров ТМС и ее возможная роль в активации рецепторов.***

Разработанный алгоритм предсказания димеров ТМ спиралей реализован в виде веб-сервера PREDDIMER, доступного на сайте Лаборатории: <http://model.nmr.ru/preddimer>. Сервер позволяет предсказывать набор конформаций гомо- и гетеродимеров на основании заданных последовательностей их ТМ спиралей, оценивать эффективность упаковки полученных димеров в соответствии со значением оценочной функции, а также визуально представлять результаты в виде 3D моделей полученных структур и 2D карт поверхностей ТМ спиралей со значениями молекулярного гидрофобного потенциала и отмеченными областями контакта. Важной особенностью метода является его способность генерировать набор конформаций димеров, часть из которых может реализовываться в зависимости от функционального состояния белка и свойств мембранного окружения. Эффективность работы сервера продемонстрирована путем сравнения результатов предсказания с 11 известными ЯМР-моделями ТМ димеров. В большинстве случаев среднеквадратичные отклонения между предсказанными структурами и ЯМР-моделями не превышают 3 Å.

Сервер был использован для предсказания структуры ТМ димеров рецептора фактора роста тромбоцитов А (PDGFRA) дикого типа и его онкогенного ТМ мутанта (V536E). Показано, что мутация модулирует упаковку ТМ димеров данного рецептора. Этот эффект, в свою очередь, может быть связан с повышенной базальной активностью (в отсутствие лиганда) у PDGFRA V536E. Работа проводится в сотрудничестве с экспериментальной группой в Католическом университете Лувена (Брюссель, Бельгия). Для ТМ домена эукариотического внутриклеточного хлорного канала (CLIC1) – амфитрофного белка – с помощью сервера были получены димерные модели. При этом в области контакта были предсказаны уникальные катион-пи взаимодействия между боковыми группами ТМ спиралей, стабилизирующие их комплекс. Существование катион-пи взаимодействий на интерфейсе взаимодействия ТМ доменов CLIC1 и их роль в стабилизации олигомеров были подтверждены экспериментально (статья на рецензии). Работа проводится в сотрудничестве с экспериментальной группой в Университете Витватерсранда (Йоханнесбург, ЮАР).

### ***3. Мультимасштабное моделирование мезоскопических биомембранных систем.***

- Методом молекулярной динамики (МД) на поверхности липидных бислоев различного состава выявлены и охарактеризованы динамические гидрофобные/гидрофильные паттерны (кластеры), определяющие т.н. «мозаичность» клеточных мембран. Показано, что модели эукариотических и бактериальных мембран существенно отличаются по параметрам кластеризации, что влияет на взаимодействие с мембранами внешних агентов – белков, пептидов, низкомолекулярных соединений. Созданные новые вычислительные методы реализованы в виде программы MemMap, предназначенной для картирования гидрофобных / гидрофильных свойств поверхности бислоевой липидной мембраны в масштабе отдельных молекул.

- Разработаны оригинальные алгоритмы выявления коллективных движений компонентов в липидных бислоях и в модельной системе вода-циклогексан-вода. Выявлены ключевые факторы, определяющие на молекулярном уровне эти процессы. В частности, впервые обнаружен ряд интересных явлений, связанных с динамикой молекул воды в присутствии липидных мембран: (1) спонтанное проникновение одиночных молекул воды в центр липидного бислоя, высокая скорость движения таких молекул и резкие изменения их направления движения; (2) наличие «переходного слоя» воды при движении из раствора (зона свободной воды) к центру мембраны – в этом слое плотность воды еще не меняется, но распределение молекул воды по скоростям уже отличается от такового в свободной воде; (3) возникновение локальных потоков воды, направленных от центра мембраны, - в области, непосредственно примыкающей к неполярной зоне мембраны. Наблюдаемые в вычислительном эксперименте динамические характеристики воды и их сильные флуктуации в центре мембраны могут иметь важное значение, способствуя быстрой реорганизации липидного бислоя в ответ на поступающие в клетку биологические сигналы – связывание/встраивание пептидов и белков, изменение трансмембранного потенциала, рН и т.д.

- Охарактеризованы эффекты т.н. «мембранного ответа» - способности липидного бислоя к структурно-динамическим изменениям при взаимодействии с внешними агентами (пептидами, белками и пр.) Показано,

что в этих процессах физико-химические свойства мембран могут играть ключевую роль, определяя параметры белок-мембранных взаимодействий, влияя на пространственную структуру мембранных белков и пептидов, регулируя биологическую активность связанных с мембраной белков – рецепторов, ионных каналов, ферментов и т.д. Одним из наиболее интересных результатов является выявленная сильная зависимость пространственной структуры димеров, образуемых трансмембранными альфа-спиралями белков, от мембранного окружения (тип липидов в бислое, их концентрация). В ряде случаев эти взаимодействия дают основной вклад в свободную энергию ассоциации спиралей при формировании димеров.

## **Разработка новых методов исследования на основе оптической микроскопии и спектроскопии и изучение функциональных свойств новых биологически-активных соединений**

### ***Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул***

При изучении конъюгатов хлорина  $e_6$  с наночастицей бис-дикарболида кобальта установлено, что ключевым структурным элементом, определяющим их высокое накопление в раковых клетках, является аминок-полиалкил-аминный линкер, соединяющий порфириновый хромофор с наночастицей. Показано, что в основе фотоиндуцированного цитотоксического эффекта, вызываемого такими наноконъюгатами, лежит фотоиндуцированное перекисное окисление липидов, пермеабиллизация лизосом и активация протеаз в цитоплазме клеток. Установлено, что присоединение аминок-полиалкил-аминного линкера к бактериохлорину позволяет получить фотодинамически активный конъюгат, который, обладая электронным поглощением, сдвинутым ближнюю ИК область, приобретает способность интенсивно накапливаться в цитоплазме раковых клеток и эффективно убивать их при облучении клеток светом.

В совместных с МНИОИ им. П.А. Герцена исследованиях обнаружено иммуномодулирующее воздействие фотодинамической терапии (ФДТ) с фотосенсибилизатором Фотосенс на клетки иммунной системы, которое выражается в активации дифференцировки моноцитов в дендритные клетки. При этом нами впервые показано, что иммуномодулирующее действие ФДТ происходит при полном отсутствии клеточной гибели.

С использованием белковых наноконструкций, встроенных в мембрану сферопластов и несущих лиганд-связывающий сайт калиевых каналов Kv1.1 и Kv1.6, разработаны и успешно апробированы методики флуоресцентной детекции лигандов каналов Kv1.1 и Kv1.6 в ядах скорпионов. Эти методики позволяют выявлять и отслеживать лиганды на всех стадиях разделения яда вплоть до моно-компонентов. С помощью методик флуоресцентной детекции охарактеризована аффинность пептида MeuKTx-1 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus* по отношению к каналам Kv1.1 ( $K_d=22\pm 3$  нМ) и Kv1.3 ( $K_d=180\pm 30$  нМ). Показана принципиальная возможность регистрации образования комплексов между флуоресцентно-меченым лигандом агитоксином 2 и гибридными белками-рецепторами в составе мицелл методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии одиночных молекул и их комплексов.

Разработана и реализована модульная схема экспериментальной установки для изучения молекулярных взаимодействий и структурных перестроек в одиночных иммобилизованных супрамолекулярных комплексах и, в частности, в нуклеосомах. В основе измерений одиночных иммобилизованных комплексов с применением разработанной установки лежит метод флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения, а для анализа структурных перестроек и межмолекулярных взаимодействий используется эффект Фёрстеровского резонансного переноса энергии. Показано, что установка может быть использована для изучения стационарных состояний, а также процессов, происходящих в одиночных комплексах, с временным разрешением от 100 пс.

## **Биотехнология (62)**

### **Нанобиогибридные материалы и инструменты для биологии и медицины**

#### ***Лаборатория молекулярной биофизики***

Проект направлен на создание нового класса инструментов на основе нанобиогибридных материалов, включающего как наноразмерные элементы на основе конъюгатов неорганических наночастиц с биологическими молекулами, для получения информации от микро- и нано-объемов биологических объектов, так и макроустройства для считывания этой информации с использованием зондовых и микроспектральных методов.

В рамках настоящего этапа получены следующие новые результаты:

(1) Сделан новый шаг в развитии нового направления в создании инструментов для изучения структурно-функциональных параметров объектов на наноуровне. Основой направления является совмещение методов зондовой сканирующей микроскопии с оптической микроскопией. На настоящем этапе к этим двум методам добавлена техника механического ультра-микротомирования. Метод позволяет реконструировать трехмерную структуру объектов (без ограничения на глубину сканирования), дает нанометровое разрешение и позволяет выявлять связь между структурными особенностями локальных участков объекта и их спектрально-оптическими характеристиками. Новый подход апробирован на исследовании структурно-функциональных исследованиях холестерических жидких кристаллов с внедренными в них квантовыми точками. Установлены особенности зависимостей оптических характеристик локальных участков жидко-кристаллической матрицы с неоднородностями распределения в ней квантовых точек. Новый подход может стать новым инструментом в

исследовании нанобиогридных материалов и структуры и свойств биологических объектов на клеточном уровне.

(2) Обнаружен эффект магнитооптической активности наночастиц благородных металлов (Au и Ag, диаметром 2-50 нм) в слабом магнитном поле (около 0,5 Т). Эффект перспективен в плане его использования в диагностике при анализе биологических жидкостей в том числе мутных. Значение сигнала магнитного кругового дихроизма (МКД) пропорционально молярному коэффициенту поглощения золотых и серебряных наночастиц. Агрегация наночастиц проявляется появлением двойной полосы в спектре МКД, что предполагается использовать для дифференциального оптического детектирования различных аналитов в мутных водных растворах.

(3) Обнаружен принципиально новый эффект аномального возрастания нелинейно-оптических параметров квантовых точек (КТ) при их гибридизации с биологическими молекулами (эффект обнаружен на примере светочувствительного белка бактериородопсина - БР). В результате формирования гибрида БР/КТ, значение нелинейного показателя преломления увеличивается до 4000 %.

Обнаруженные эффекты по п. (2) и (3) модулируются степенью комплексообразования металлических наночастиц или полупроводниковых нанокристаллов с биологическими молекулами, определяет потенциальную возможность создания нового класса биосенсоров. Полученные результаты важны как с точки зрения фундаментальной науки, так и в плане возможных практических применений.

## **ПЭМ и АСМ исследования нанобиоструктур**

### ***Группа электронной микроскопии***

- Была продемонстрирована эффективность бактериального биолюминесцентного сенсора для определения токсичности нанотрубок из углерода и нитрида бора. Для этого были синтезированы нанотрубки, проведены эксперименты по определению токсичности нанотрубок с различными характеристиками. Обнаружено, что токсикологическое действие таких нанотрубок определяется в основном их геометрическими параметрами. В результате их взаимодействия с клетками бактериального люминесцентного сенсора происходит их механическое разрушение.

- Методом атомно-силовой микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии была показана возможность и эффективность пришивки апконверсионных наночастиц к мини антителам scFv4D5 с помощью высокоспецифичного линкера барстар:барназа (Bs:Bn). Такая система специфически связывается с молекулами, выделяемыми клетками SK-BR-3 рака молочной железы, позволяя проводить оптическое детектирование таких клеток.

- Создан задел в области создания композитных материалов на основе биомакромолекул и нанотрубок из углерода и нитрида бора, а также слоистых графеноподобных наноматериалов различного состава.

## **Модификация пептидов и белков терапевтического назначения.**

### ***Группа прикладных исследований пептидов и белков***

#### ***Ацилирование рекомбинантных инсулинов углеводсодержащими лигандами.***

Целью модификации инсулинов в настоящих исследованиях было создание химически модифицированных производных инсулина человека или его генно-инженерных аналогов, способных взаимодействовать с эндогенными или экзогенными высокомолекулярными соединениями (белки, полисахариды, полиэлектролиты и т.д.). Итогом этих исследований может стать создание композиций, пригодных для различных способов введения, обладающих существенным пролонгированным (возможно, глюкозозависимым) гипогликемическим действием. Объектом исследований был выбран генно-инженерный инсулин лизпро (ИБХ РАН). В качестве углеводсодержащих лигандов в работе были использованы N-ацетил-D-глюкозаминил-(β 1-4)-N-ацетил-D-мурамовая кислота, дисахаридное звено иммуномодуляторов из клеточных стенок бактерий, обладающих иммуно-регулирующим и противоопухолевым действием (ИБХ РАН) и синтезированные нами соединения: модифицированный дисахарид, β-N-стеароилглицил-[N-ацетил-D-глюкозаминил-(β 1-4)]-N-ацетил-D-мурамоиламино-капроновая кислота и N<sup>α</sup>-пальмитойл-N<sup>ε</sup>-[N-ацетил-D-глюкозаминил-(β 1-4)-N-ацетил-D-мурамоил]-L-лизил-глицин. Ацилирование аминокетильных групп инсулина проводили методом активированных эфиров, в качестве ацилирующих агентов использовали оксисукцинимидные эфиры соответствующих лигандов.

В результате исследований получены новые N-ацилированные производные генно-инженерного инсулина лизпро: тризамещенный N<sup>αA1</sup>N<sup>αB1</sup>-ди [N-ацетил-D-глюкозаминил-(β 1-4)-N-ацетил-D-мурамоил]-N<sup>εB28</sup>-пальмитойлинсулин лизпро с мол.массой 7003,0/7003,9 Da (расчетная/измеренная) и монозамещенные N<sup>εB28</sup>-{β-N-стеароилглицил-[N-ацетил-D-глюкозаминил-(β 1-4)]-N-ацетил-D-мурамоиламино-кап-роил}-инсулин лизпро с мол.массой 6739,8/6738,9 Da и N<sup>εB28</sup>-{N<sup>α</sup>-пальмитойл-N<sup>ε</sup>-[N-ацетил-D-глюкозаминил-(β 1-4)-N-ацетил-D-мурамоил]-L-лизилглицил}-инсулин лизпро с мол.массой 6709,8/6710,5 Da. Степень чистоты полученных соединений (ВЭЖХ) составила около 90%. Данные масс-спектрометрии, пептидного картирования и степень модификации аминокетильных групп полностью соответствовали ожидаемым структурам. В экспериментах по протеолизу полученных соединений установлена повышенная на 50-80% устойчивость соединений к протеолизу в сравнении с исходным гормоном, в опытах на животных обнаружена высокая гипогликемическая активность модифицированных производных – 60-85% от исходной активности инсулина лизпро в зависимости от степени ацилирования

### ***Ограниченный протеолиз рекомбинантной IgA1 протеазы из *N.meningitidis*.***

Цель данного этапа исследований – выяснить возможность использования укороченных аналогов IgA1 протеазы для защиты от менингококковой инфекции. Для этого были исследованы условия протеолитического расщепления (концентрации ферментов, pH буфера, температура, время реакции) IgA1 протеазы *N. meningitidis* серогруппы В (штамм Н44/76) под действием трипсина и химотрипсина. В результате обнаружено, что ограниченный набор фрагментов белка может быть получен только с химотрипсином и только в жестких денатурирующих условиях (в присутствии 6-8 М мочевины). Полученные результаты показали принципиальную возможность использования фрагментов IgA1 протеазы для защиты от менингококковой инфекции. В дальнейшем мы планируем использовать в работе рекомбинантные укороченные аналоги IgA1 протеазы.

Для выбора потенциальных фрагментов молекулы IgA1 протеазы с целью получения противоменингококкового протективного антигена мы использовали разработанный в ИБХ РАН метод анализа информационной структуры, АНИС метод, который позволяет исследовать иерархическую организацию структурной информации, записанной в аминокислотных последовательностях белков. Анализ данных, полученных для IgA1 протеазы, показывает, что существует около двадцати вариантов фрагментации молекулы белка по ЭЛИС. Выбор между ними будет сделан на основании данных о потенциальных В- и Т-эпитопах фермента и локализации иммуноактивных участков, важных для индукции протективного иммунного ответа.

### **Получение и исследование новых полимерных материалов для биосепарации и биоанализа, иммобилизации клеток и молекул (ферментов, пептидов, биолигандов, ДНК и др.) и разработка новых методов и систем на основе предложенных материалов *Лаборатория полимеров для биологии***

Разработаны эффективные способы активирования поверхностей носителей различной природы (стеклянные капилляры, синтетические мембраны) с целью локализации процесса формирования биосовместимых полимерных нанотолщинных покрытий на поверхности указанных носителей. В частности, с учетом полученных ранее закономерностей протекания полимеризации анилина на поверхности объемно-пористых дисперсных кремнеземов оптимизированы условия получения наноразмерных полианилиновых (ПАНИ) покрытий на внутренней поверхности стеклянных мультикапилляров с использованием оригинальной установки. Активация поверхности носителя достигалась предварительным нанесением тонких (до 3 нм толщиной) фторопластовых покрытий, служащих матрицей для полимеризации анилина. При этом на поверхности фторированной матрицы эффективно удерживаются олигомерные фенозин-содержащие фрагменты, образующиеся в течение т.н. «индукционного периода» полимеризации, которые затем служат зародышами роста макромолекул ПАНИ. Определены оптимальные значения температуры проведения процесса и величины расхода реакционной смеси в зависимости от геометрических характеристик использованных мультикапиллярных систем. Проведен научно-обоснованный выбор синтетической мембраны, пригодной для использования в качестве носителя при получении сорбентов для одностадийного выделения нуклеиновых кислот. Показано, что при использовании выбранной мембраны в качестве подложки для полимеризации анилина на поверхности носителя образуется устойчивый равномерно распределенный слой ПАНИ, а фторированная мембрана служит «матрицей» для формирования ПАНИ-покрытия.

На первом этапе получения ратиометрических термосенсоров на основе CdSe/ZnS нанокристаллов разработана методика формирования слоя термочувствительного полимера поли-N-винилкапролактама на поверхности частиц сополимера акролеина со стиролом (d=200 нм) в условиях низкотемпературной радикальной полимеризации в присутствии окислительно-восстановительной иницирующей системы (гидроперекись изопропилбензола - сульфат железа (II) - ронгалит). Такой способ создания термочувствительного покрытия позволяет получать сополимерные частицы практически без изменения интенсивности флуоресценции предварительно введенных в них CdSe/ZnS нанокристаллов.

Исследована цитотоксичность ап-конвертирующих нанофосфоров (НАФ) и способов их модификации в экспериментах *in vitro* с использованием МТТ теста (состояние дыхательной цепи) и с помощью теста дифференциального окрашивания клеток. В целом, НАФ демонстрируют умеренную цитотоксичность в отношении кератиноцитов HaCaT (снижение числа живых клеток в популяции кератиноцитов HaCaT составило 22%, по сравнению с контролем) и практически не препятствуют пролиферации фибробластов. Способ модификации НАФ оказывает существенное влияние на их цитотоксическое действие. Найдено, что НАФ, инкапсулированные в полимерные частицы на основе полистирола, практически не вызывают гибели клеток. Модификация НАФ, основанная на методе «испарения растворителя», с помощью которого получены НАФ с покрытиями из амфифильных полимеров, полилактида и сополимера лактида с гликолидом, обеспечивает наилучшую выживаемость клеток (снижение числа живых клеток на 10-25%). НАФ, модифицированные за счет образования водородных связей, а также при использовании метода последовательного осаждения противоположно заряженных полимеров, имели видимый токсический эффект (снижение числа живых клеток на 33-40%).

Исследованы иммуногенные и протективные свойства фрагментов IgA1 протеазы из *Nesseeia meningitidis* (ХТР1, ХТР2, ХТР3, ХТР4), полученные ограниченным протеолизом полноразмерного фермента химотрипсином. Полученные фрагменты отличались по молекулярной массе, причем, образец ХТР3 содержал только N-концевые фрагменты молекулы IgA1 протеазы, а ХТР4 – только C-концевые участки белка.

Иммуногенную и протективную активность полученных фрагментов IgA1 протеазы оценивали на мышах линии Balb/c. Во всех группах мышей, иммунизированных полученными фрагментами, показана выраженная защита лабораторных животных от заражения живой культурой менингококков серогруппы В. Число КОЕ в крови зараженных животных составляло 11-33% по сравнению с не иммунизированными мышами (100%) и не отличалось от этого показателя в группе мышей, иммунизированных исходным полноразмерным препаратом IgA1 протеазы (около 30%).

Разработаны биосовместимые пленочные материалы (ПМ, с толщиной от 100 мкм до 1 мм) на основе природных полисахаридов, хитозана, декстрансульфата, альгината натрия, и их комбинаций. Исследованы некоторые механические и физико-химические свойства полученных ПМ. Изучена сорбция клеток животных на поверхность полученных ПМ, показано, что при культивировании в малых объемах (капли 200-500 мкл, на сухой поверхности чашки Петри) наблюдается существенное улучшение параметров роста клеток животных.

Разработан способ получения наночастиц типа «ядро-оболочка» на основе нетоксичных и биodeградируемых полимеров. Наночастицы использовались для получения алерговакцины нового типа, содержащей ковалентно связанные В- и Т-эпитопы белка алергена. В качестве модели использовали рекомбинантные белки-аллергены клещей домашней пыли (КПД). При этом В-эпитопы были маскированы в составе ядра, а Т-эпитопы экспонировались на оболочке. При проведении биологических испытаний было установлено, что полученная конструкция обеспечивает стимуляцию гуморального антигенспецифического иммунного ответа (благодаря продукции IgG) и не связывается с IgE из сывороток больных с аллергией на КПД, и, следовательно, исключает возможность побочного (воспалительного) действия.

Получены водные дисперсии частиц нанокремния nc-Si, стабилизированные поливинилпирроллидом и полиметилакрилатом с октадецином, сохраняющие свои флуоресцентные свойства в широком диапазоне диаметров с функциональными группами на поверхности для последующей конъюгации биополимерами. Исследованы электрофизические свойства композитов на основе частиц нанокремния nc-Si и соли тетраанилина TA/TSA. Импеданс спектры действительной и мнимой диэлектрических проницаемостей чистых плёнок nc-Si и плёнок с добавлением TA/TSA показали, что добавление соли в систему приводит к увеличению  $\epsilon'$  в 7 раз. Это означает, что использование такой пленки в качестве наполнителя конденсатора увеличивает его емкость в 67 раз. Было также обнаружено, что величина проводимости плёнок nc-Si TA/TSA возрастает примерно на порядок. Таким образом, при совместном использовании тетраанилина и наночастиц кремния наблюдается синергетический эффект.

Получены биodeградируемые микроносители на основе различных полилактоидов с аморфной и кристаллической структурой для их дальнейшего использования в тканевой инженерии. Разработаны методы модификации поверхности полученных микроносителей с целью улучшения адгезии, роста и пролиферации клеток. Проведены исследования по культивированию модельной линии клеток (мышинных фибробластов L929) на полученных микроносителях. Методами оптической, конфокальной и сканирующей электронной микроскопии показано, что прикрепление, рост и пролиферация клеток сильно зависят от топографии (размер пор, шероховатость поверхности) и «химии поверхности» микроносителей (тип поликатиона, количество заряженных групп и т.д.). В качестве поликатионов для модификации поверхности микроносителей были использованы хитозан, сополимер хитозана с молочной кислотой и другие биосовместимые биоразлагаемые полимеры. Методом электроформования получены образцы нано- и микроволокон на основе смеси хитозана и поливинилового спирта (ПВС) различного состава. Цитотоксичность полученных образцов будет исследована на культурах клеток с использованием экстракт- и контакт-тестов.

Разработаны методы включения ДНК в наноконтейнеры (50-100 нм) на основе амфифильных полимеров.

## **Разработка биотехнологии синтеза новых модифицированных нуклеозидов с помощью ферментов нуклеинового обмена**

### ***Лаборатория биотехнологии***

*Создание химико-ферментативных подходов к синтезу серии новых 2,6-пурин-дизамещенных нуклеозидов.*

В результате выполнения экспериментальных работ разработаны химико-ферментативные способы синтеза и получены новые модифицированные нуклеозиды 2-хлор-пурина, содержащего в С6-положении остатки хиральных аминокислот (серина, лизина и т.п.) с целью изучения их противоопухолевой активности и цитотоксичности. Остаток углевода представлен рибозой, 2'-дезоксирибозой, 3'-дезоксирибозой и 2-фторарабинозой.

Показана технологическая целесообразность применения каскадного синтеза модифицированных нуклеозидов с применением генно-инженерных ферментов нуклеинового обмена: нуклеозидфосфорилаз, рибкиназ (РК) и фосфопентомутаз (ФПМ) для получения серии новых нуклеозидов 2-фторарабинозы, модифицированных по С2 и С6 остатку пурина. Проведен синтез клинически важных противоопухолевых нуклеозидов (кладрибина и клофарабина) с помощью каскадных ферментативных реакций.

Разработаны способы получения 2,6-пуриндизамещенных модифицированных нуклеозидов, содержащих в С6-положении остатки хиральных аминокислот (серина, лизина и т.п.) и не природные остатки 3'-дезоксирибозы, арабинозы и 2'-фторарабинозы. Получены первые результаты тестирования противоопухолевой активности синтезированных соединений на клеточной линии Т-лимфобластного лейкоза U937. Отобраны наиболее активные соединения для проведения дальнейшего изучения. На основе полученных данных активность-структура определены направления дальнейших изменений структуры модифицированных нуклеозидов.

*Экспериментальные работы по синтезу новых нуклеозидов на основе 4,5,6-тризамещенных бензимидазолов с измененным углеводным остатком для тестирования противоопухолевой активности.*

В результате выполнения экспериментальных работ была получена серия новых нуклеозидов на основе 4,5,6-тризамещенных бензимидазолов с модифицированными остатками сахаров, представленными 3'-дезоксирибозой, 2'-фтор-арабинозой. Синтез новых нуклеозидов на основе 4,5,6-тризамещенных бензимидазолов биотехнологическим способом позволил не только выявить закономерности химико-ферментативных превращений серии 4,5,6-тризамещенных бензимидазолов на активном центре ферментов нуклеозидфосфорилаз, но и получить новые модифицированные нуклеозиды ряда бензимидазолов (пятнадцать соединений) для изучения их противоопухолевой и противовирусной активности. В процессе синтеза обнаружили, что в реакционных смесях присутствует два продукта с эквивалентными массами, что свидетельствует об образовании N7-N9-изомеров нуклеозидов. Целевые продукты (и их изомеры, до 10 % по данным ВЭЖХ) из реакционной смеси выделялись с помощью обращеннофазовой хроматографии. Синтезированные соединения охарактеризованы данными ВЭЖХ, масс-спектрометрии и <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии. Нароботаны партии, достаточные для проведения первичного скрининга на противовирусную и противоопухолевую активность. Таким образом, впервые с помощью пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli* получена серия из пятнадцати новых нуклеозидов на основе 4,5,6-тризамещенных бензимидазолов рибо-, 2'-дезоксирибо-, 3'-дезоксирибо- и 2'-фторарабино-рядов для тестирования противоопухолевой и противовирусной активности.

## **Разработка эффективных биотехнологий получения полипептидов медицинского назначения с использованием созданных штамм-продуцентов**

### ***Лаборатория биотехнологии***

В результате выполнения основных этапов работы были получены следующие результаты:

- штамм-продуцент изоформы фактора роста эндотелия сосудов человека (VEGF165b), с использованием новых экспрессионных прокариотических систем.
- штамм-продуценты рекомбинантных аналогов природных ингибиторов тромбина - анофелина из молярийного комара *Anopheles albimanus* и вариегина из тропического клеща *Amblyomma variegatum*
- опытный образец рекомбинантного препарата - фактора роста эндотелия сосудов человека изоформа 165b (VEGF165b).
- опытные образцы рекомбинантных препаратов - аналогов тимозина бета 4 для изучения их биологических свойств.

Для выполнения поставленных задач были выполнены следующие работы:

- методами генной инженерии получен синтетический ген VEGF165B и клонирован в экспрессионный вектор.
- подобраны условия ферментации штамм-продуцента, экспрессирующего рекомбинантный ген VEGF165B
- разработана методика выделения рекомбинантного VEGF 165B и наработан препарат для проведения биологических исследований
- получены методами генной инженерии синтетические гены анофелина из молярийного комара *Anopheles albimanus* и вариегина из тропического клеща *Amblyomma variegatum*.
- клонированы синтетические гены анофелина из молярийного комара *Anopheles albimanus* и вариегина из тропического клеща *Amblyomma variegatum* в соответствующие экспрессионные вектора
- осуществлено масштабирование стадий ферментации и хромаграфического выделения аналогов тимозина бета 4.
- Охарактеризованы образцы аналогов тимозина бета 4 физико-химическими методами.

Полученные результаты можно применять при разработке отечественных высокоэффективных биотехнологий с последующим их внедрением в фармпроизводства рекомбинантных полипептидных препаратов медицинского назначения для лечения социально значимых заболеваний.

## **Разработка методических подходов для доклинических исследований новых биотехнологических лекарственных средств**

### ***Лаборатория биологических испытаний***

Разработаны *in vivo* модели для изучения купирования острой и лечения хронической нейропатической боли различной этиологии с помощью РТ1. Определены максимальная толерантная доза и дозы, которые не вызывают побочные эффекты при однократном и многократном введениях РТ1. Изучены органы-мишени к РТ1, а также определена дозовая зависимость патологических изменений, выявленных при однократном и многократном введениях РТ1, и их обратимость.

## **Разработка новых подходов в создании и криосохранении генномодифицированных животных-биомоделей в соответствии с требованиями AAALAC и ISO**

### ***Питомник лабораторных животных ФИБХ***

Исследовано влияние основных криопротекторов различной природы (ДМСО, глицерин, этиленгликоль, сахароза, бычий сывороточный альбумин) на жизнеспособность ранних эмбрионов мышей,

содержащихся в условиях ПЛЖ, при проведении процедуры криоконсервации. Установлено, что наилучшими криопротекторными свойствами обладает раствор 10% глицерина в 1М растворе сахарозы совместно с добавлением 5% бычьего сывороточного альбумина. При использовании такого криопротектора до 90% эмбрионов, подвергшихся замораживанию, успешно проходят процедуру размораживания и развиваются до стадии бластоцисты при последующем культивировании *in vitro*. При использовании в качестве основного криопротектора этиленгликоля, количество нормально развивающихся эмбрионов составил порядка 60%. Применение ДМСО, в качестве криопротектора, позволяло нормально развиваться лишь 40% заморожено-разморо эмбрионов.

Проведено исследование программного замораживания и быстрой заморозки (витрификация, мгновенного погружения в жидкий азот) ранних эмбрионов мышей, содержащихся в условиях ПЛЖ. Установлено, что процедура витрификации позволяет значительно повысить выживаемость ранних эмбрионов по сравнению с процедурой программного замораживания на 30%. Основным критерием успешного использования процедуры быстрого замораживания является использование системы проникающего (глицерин) и непроникающего (сахароза) криопротекторов, позволяющих значительно повысить выживаемость ранних эмбрионов.

### **Разработка систем синтеза рекомбинантных белков на основе растительных экспрессионных платформ (биофарминг)**

#### ***Лабораторией экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон)***

В ходе выполнения проекта были выбраны наиболее оптимальные виды растений-продуцентов рекомбинантных протеинов. Наиболее подходящим видом является ряска малая, так как она характеризуется высоким содержанием белка и высокой скоростью роста, нетребовательна к составу питательных сред. Также, хорошей экспрессионной платформой является табак, что связано с быстротой его генетической трансформации, легкостью получения трансгенных растений и их культивирования. Изучение структуры векторных конструкций показало необходимость использовать сигналы внутриклеточной компартиментализации целевого белка, а также целесообразность использования энхансированных промоторов. Исходя из полученных результатов, были сконструированы экспрессионные кассеты и трансформационные вектора для экспрессии в растениях табака и ряски малой различных антигенных детерминант вирусов гриппа птиц и свиней, вируса бешенства.

### **Разработка биотехнологической платформы для эффективного синтеза 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов как предшественников биосинтеза ДНК»**

#### ***Группа технологии синтеза нуклеиновых кислот и их компонентов ФИБХ***

Оптимизирован способ и отработана методика культивирования штамма-продуцента полифосфаткиназы из *Ps. aeruginosa* на основе штамма *E. coli*, позволяющая получать до 35% целевого белка от общего белка клетки.

Оптимизирован способ и отработана методика очистки фермента, включающая :

- выделение фермента в виде телец включения,
- ренатурацию фермента из телец включения,
- очистку фермента в одну стадию с помощью металл-хелатной хроматографии с выходом целевого белка до 65%.

### **Исследование структурно-функциональных особенностей фаговых/бактериальных ферментов и регуляторных элементов генома прокариот, перспективных для разработки биотехнологических и медицинских технологий.**

#### ***Группа молекулярной биотехнологии ФИБХ РАН***

Получены экспрессионные генно-инженерные конструкции, содержащие ген L-аланоил-D-глутаматпептидазы бактериофага T5, разработана схема получения и выделения  $C^{13}$ - $N^{15}$  – меченого фермента в количестве, достаточном для исследования структуры белка в растворе методом ЯМР. Исследованы структурно-функциональные особенности некоторых фаговых ферментов, перспективных для биотехнологии.

В рамках исследования структуры белка получен ряд генно-инженерных конструкций, содержащих ген L-аланоил-D-глутаматпептидазы бактериофага T5, в том числе химерных молекул, а также двух вариантов ретропоследовательностей, содержащих гистидины на одном из концов молекулы белка. Разработана схема получения и выделения  $C^{13}$ - $N^{15}$  – меченого фермента в количестве, достаточном для исследования структуры белка в растворе методом ЯМР, включающая выращивание штамма-продуцента на минимальной среде с добавлением меченых субстратов и дальнейшую хроматографическую очистку белка. Разработаны способы очистки белков – растворимых из супернатанта, нерастворимых из телец включения - с использованием металлохелатной хроматографии, а также ионообменной хроматографии на разных носителях. Разработан способ ренатурации плохо растворимых ретробелков с помощью медленного диализа в кислой среде. Результатом процессов очистки являются электрофоретически гомогенные, хорошо растворимые препараты меченой L-аланоил-D-глутаматпептидазы, двух ее ретровариантов, TEV-протеазы, термостабильной

нуклеозидфосфорилазы. Завершено изучение особенностей строения активного центра дНМФ-киназы бактериофага T5, результаты исследования опубликованы.

Исследован характер изменений функциональной активности кластеризованных промоторов при делетировании и/или комбинировании их отдельных элементов и конструировании химерных промоторных структур. Проведено сравнительное исследование ферментативной активности препаратов термостабильных пуриннуклеозидфосфорилаз полученных при внутриклеточной и периплазматической продукции ферментов.

В 2013 г. исследовано влияние положительной суперскрученности, индуцированной налидиксиновой кислотой, на уровень активности противонаправленных промоторов, локализованных в области «промоторного островка», предшествующего гену *appY*. Ранее было показано, что, несмотря на обогащенность этого участка генома потенциальными сайтами инициации транскрипции, в пределах 377 н.п. активны 2 противонаправленных промотора. В присутствии налидиксина (0,5 мкг/мл) наблюдается преимущественная активация одного из двух промоторов, обладающего большей способностью к инициации транскрипции. Полученные результаты указывают на индукцию избыточной отрицательной суперспирализации в межпромоторной области. Обнаруженный эффект не наблюдался в случае однонаправленного сильного промотора *svch*, обнаруженный ранее в плазмиде, супрессирующей фитопатогенность *Erwinia carotovora*.

### **Модификация состава древесины и фенотипа растений осины путем суперэкспрессии гена ксилотрансферазы *sr-Xeg* и ингибирования экспрессии гена кумарат-КоА-лигазы** *Группа лесной биотехнологии ФИБХ*

Выполнены работы по этапу «Клонирование векторных конструкций и генетическая трансформация растений осин», получены следующие результаты:

- Разработаны схемы клонирования бинарного вектора, несущего экспрессионную кассету с фрагментами гена 4CL, проведено молекулярное клонирование и сконструирована плаزمиды pBI4CL. Размер бинарного вектора, несущего данную конструкцию составил 13670 п.о.

- Разработаны схемы клонирования экспрессионной кассеты с геном ксилотрансферазы, проведено молекулярное клонирование и сконструирована плазмиды pBI-Xeg. Размер бинарного вектора, несущего данную конструкцию составил 13691 п.о.

Функциональность созданных векторов подтверждена путем проведения агробактериальных трансформаций растений осины.

### **Разработка технологии очистки окружающей среды от устойчивых пестицидов с помощью природных возобновляемых фотодеструкторов - гуминовых веществ** *Группа молекулярной экологии*

Впервые ВЭЖХ последнего поколения на колонке с обращенной фазой в ступенчатом и линейном градиентах метанола с детекцией спектров поглощения и флуоресценции в режиме реального времени была использована для анализа гуминовых кислот (ГК), экстрагированных различными методами. Полученные данные экспериментально доказали, что гидрофобность ГК существенно возрастает по мере их экстракции из почвы, во многом определяя их физико-химические свойства.