

СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ

17 декабря
2018 года

материалы конференции



• Биомолекула

Москва



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

I межвузовская студенческая конференция
СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2018

17 декабря 2018 г.

Материалы конференции
(электронная версия)

Москва – 2018

УДК 577
ББК 28.072

Оргкомитет благодарит руководство биологического факультета МГУ за помощь в проведении конференции и издании настоящего сборника

Оргкомитет конференции

Н.Б. Гусев (председатель оргкомитета), А.Г. Катруха (заместитель председателя оргкомитета), Д.В. Серебряная (ответственный секретарь), Е.П. Альтшулер, Л.К. Муранова, О.И. Клычников, В.М. Шатов, Л.Р. Ибнеева

СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2018: I межвузовская студенческая конференция: 17 декабря 2018 г., Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет: Материалы конференции / Отв. ред. Н.Б. Гусев. Сост. Е.П. Альтшулер. - М.: Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, 2018. - 76 с.

ISBN 978-5-9500298-4-4

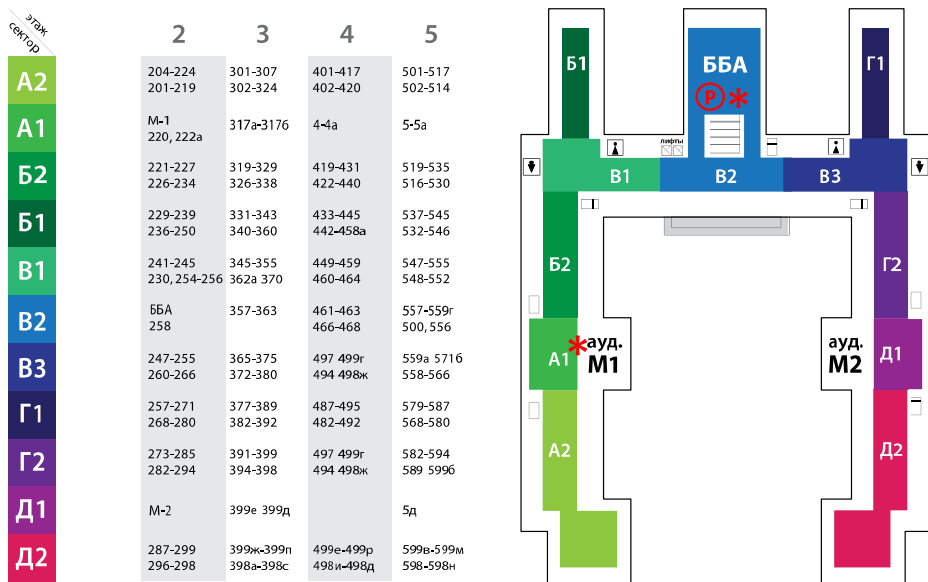
УДК 577
ББК 28.072
ISBN 978-5-9500298-4-4



Программа форума

9:00–10:00	Регистрация участников <i>(Рекреация перед Большой Биологической Аудиторией; ББА)</i>
10:00–10:15	Открытие форума <i>(Малая Аудитория 1; М1)</i>
10:15–12:15	Устные доклады участников конференции <i>(Малая Аудитория 1; М1)</i>
12:15–13:00	Обеденный перерыв <i>(Рекреация под аудиторией М1)</i>
13:00–15:30	Постерная сессия: <ul style="list-style-type: none">• Секция «Биохимия» <i>(Рекреация перед аудиторией ББА)</i>• Секция «Молекулярная и клеточная биология» <i>(Рекреация перед аудиторией М1)</i>• Секция «Физиология и медицинская биохимия» <i>(Рекреация перед аудиторией М1)</i>
15:30–16:00	Перерыв на кофе, совещание жюри
16:00–17:00	Заккрытие форума, вручение призов победителям <i>(Аудитория ББА)</i>

Схема здания биологического факультета



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

Обозначения:

- P • место регистрации (2 этаж, рекреация перед ауд. ББА)
- доклады и открытие форума
- * • секция «Биохимия» в рекреации перед ауд. ББА (2 этаж)
- секции «Молекулярная и клеточная биология» и «Физиология и медицинская биохимия» в рекреации перед ауд. М1 (2 этаж)
- обеденный перерыв в рекреации под ауд. М1 (1 этаж)
- закрытие форума в ауд. ББА (2 этаж)



+7 916 173-47-10 Серебряная Дарья Владимировна

+7 916 317-19-43 Альтшулер Евгений Петрович

+7 985 923-22-48 Катруха Алексей Генрихович

Секция «Доклады»

Д1. Изучение адаптивного иммунитета *Asteria rubens* при стимуляции *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*

П.С. Шнудейко (pshpudeiko@gmail.com), Н.В. Азбукина, И.А. Дюгай, И.Д. Никитин
Факультет Биоинженерии и Биоинформатики Московского Государственного Университета
им. М.В. Ломоносова

Введение. Большинство представителей Metazoa обладают врожденным иммунитетом, однако до сих пор неизвестно, способны ли они к формированию иммунной памяти. Целью данной работы было разработать модель для изучения адаптивного иммунитета у морских звезд (*Asteria rubens*) в ответ на попадание прокариотических клеток в их целом.

Материалы и методы. В качестве первичного стимула (иммунизации) использовались клетки *Escherichia coli*, которые вводили в целом морской звезды. Через три дня производилось повторное заражение морских звезд смесью бактерий *E. coli* и *Bacillus subtilis*, и сравнивалась скорость изменения количества бактерий в целоме. Для оценки изменений содержания бактерий при первичной и вторичной иммунизации применялись два подхода: (1) количественная ПЦР со специфическими праймерами к каждому из видов; (2) флуоресцентная микроскопия: в целом звезд вводили бактерии с флуоресцентными метками (FITC или GFP).

Результаты. Мы определили, что целомоциты поглощают бактерии обоих видов, при этом не наблюдается специализации целомоцитов по отношению к грамположительным или грамотрицательным бактериям. Отдельная клетка способна фагоцитировать одновременно оба вида бактерий. Целомоциты активно захватывали как живые (помеченные GFP), так и мертвые (помеченные FITC) бактерии. Содержание ДНК бактерий в целомической жидкости уменьшалось приблизительно в 4 раза через 3 часа после попадания бактерий в целом. Предварительный анализ показал, что повторная иммунизация увеличивает скорость очищения целомической жидкости от смеси бактерий в два раза. Для определения специфичности иммунной памяти были подобраны специфичные праймеры на *E. coli* и *B. subtilis*, позволяющие оценивать концентрацию ДНК этих бактерий в одной пробе целомической жидкости.

Выводы. В ходе проведенных экспериментов разработана модель, позволяющая изучать специфичность, эффективность и время формирования иммунной памяти *Asteria rubens* в ответ на введение в целом бактериальных клеток.

Д2. Выявление мутаций в генах BRCA1/2, ассоциированных с повышенным риском развития рака молочной железы, у пациентов Центрально-Черноземного региона РФ

М.В. Грязнова (mariya-vg@mail.ru), А.В. Паневина., С.А. Солодских, В.Н. Попов
Кафедра генетики, цитологии и биоинженерии ФГБОУ ВО «ВГУ»

Введение. Рак молочной железы является самой распространенной онкопатологией среди женского населения. На гены BRCA1/2 приходится до половины наследственных мутаций при раке молочной железы. Карта распространения мутаций

BRCA1/2 в России неполна и фрагментарна. Значительная часть регионов России остается не исследованной.

Целью исследования является обнаружение патогенных вариантов мутаций генов BRCA с высоким потенциалом в качестве предсказательного биомаркера наследственного рака молочной железы.

Материалы и методы. Проведен анализ 192 образцов ДНК от индивидуумов с раком молочной железы и/или имеющих родственников I-II степени родства с подтвержденным раком молочной железы или яичников. Оценка спектра мутаций в генах BRCA1/2 проводилась с использованием системы Ion Torrent PGM с помощью панели Ion AmpliSeq BRCA1/2.

Результаты. Было проведено полногеномное секвенирование BRCA1/2 192 образцов ДНК. Обнаружено 76 мутаций, из которых 64,5% встречаются единожды, а 19,3% - не описанные ранее. В результате сравнения мутаций генов BRCA1/2 индивидуумов с раком молочной железы и/или имеющих родственников I-II степени родства с подтвержденным раком молочной железы или яичников, выявлено, что вариант 5019G>A, представленный в 8,33% случаев, и вариант 5744C>T, представленный в 5,73% случаев, связаны с риском наследственного рака молочной железы. Также, мутация 5382insC гена BRCA1, которая признана клинически значимой, встречается в 6,77 % случаев.

Выводы. Обнаруженные полиморфизмы 5019G>A и 5744C>T, связаны с риском наследственного рака молочной железы. Вариант 5019G>A ассоциирован со сниженным риском РМЖ, в то время, как вариант 5744C>T – с повышенным. Накопление данных по специфическим для населения мутациям, увеличивающих риск развития наследственного рака молочной железы, позволит разработать диагностические панели и использовать их в обычной клинической практике.

Д3. Функциональная роль полиморфных вариантов ДНК-гликозилазы NEIL2 человека в репарации ДНК

З.И. Каххарова¹ (zarinkaapels@gmail.com), Д.В. Петрова^{1,2}, И.Р. Грин^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет

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

Введение. Белок NEIL2 относится к группе ферментов, называемых ДНК-гликозилазами, роль которых состоит в удалении из ДНК поврежденных оснований и инициации процесса репарации ДНК. NEIL2 отличается от других ДНК-гликозилаз своей уникальной способностью удалять повреждения из участков ДНК в форме «глазков», интермедиатов транскрипции и репликации. Известно, что полиморфизмы гена *hNEIL2* ассоциированы с повышенным риском развития онкологических заболеваний, в том числе, одного из самых опасных – рака легких. Поэтому изучение функциональных свойств полиморфных вариантов белка NEIL2 актуально для понимания механизмов и предсказания риска онкологических заболеваний.

Материалы и методы. Методом сайт-направленного мутагенеза был получен ряд плазмид, содержащих однонуклеотидные полиморфные варианты гена *hNEIL2*. С помощью метода аффинной хроматографии выделены соответствующие реком-

бинантные белки. Субстратная специфичность полиморфных вариантов охарактеризована в отношении способности удалять различные окисленные основания из двуцепочечной ДНК, одноцепочечной ДНК, и ДНК, содержащей структуру типа «глазок».

Результаты. С применением биоинформатических подходов были выбраны однонуклеотидные полиморфные варианты R103W и P304T, для которых замена аминокислоты могла влиять на процессы ферментативного катализа и субстратного узнавания. Для всех полученных белковых вариантов гена *hNEIL2* ДНК-гликозилазная активность понижалась в ряду: ДНК-субстрат «глазок», оцДНК, дцДНК. При этом активность полиморфного варианта *hNEIL2*(P304T) была в 3 раза ниже по сравнению с активностью стандартного полиморфного варианта *NEIL2*, тогда как активность *hNEIL2*(R103W) падала незначительно.

Выводы. Результаты исследования подтверждают предположение о влиянии одонуклеотидных полиморфизмов, встречающихся в популяции человека, на активность фермента *hNEIL2*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта № 18-44-540029\18.

Д4. Возможная роль гомологов С-домена ОСР в регуляции механизма фотозащиты цианобактерий

Ю.Б. Слонимский (santloxan@bk.ru)

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова Биологический факультет, кафедра биохимии

Введение. Оранжевый каротиноид-связывающий белок (ОСР) – участник механизма фотозащиты цианобактерий, представляющий собой фотоактивный двухдоменный белок, несущий молекулу каротиноида. Фотоактивация ОСР сопровождается изменением спектральных свойств молекулы каротиноида и существенным изменением конформации белка. Фотоактивированная красная форма ОСР (ОСР^R) способна связываться со светособирающими антеннами цианобактерий – фикобилисомами, что приводит к тепловой диссипации энергии возбуждения, предотвращая образование активных форм кислорода и повреждение клетки. Структурные изменения ОСР обратимы, и в темноте ОСР медленно возвращается в исходное состояние (ОСР^O). При филогенетическом анализе последовательностей ОСР различных цианобактерий было показано, что существует множество гомологов С- и N-концевых доменов ОСР. Гомологи доменов ОСР, представленные в различных цианобактериях отдельными независимыми белками, в последнее время привлекают к себе повышенное внимание как с точки зрения исследования эволюции формирования фотоактивного ОСР, так и с точки зрения их особенных, уникальных свойств. Функции гомологов С-домена ОСР (СТДНs) неизвестны, однако недавно был открыт уникальный механизм переноса каротиноидов из С-домена ОСР (белок СОСР) в апоформу N-домена ОСР с образованием метастабильного ОСР-подобного белка, что предполагает участие СТДНs во внутриклеточном переносе каротиноидов.

Материалы и методы. Клонирование генетических конструкций, бактериальная экспрессия и очистка рекомбинантных каротиноид-связывающих белков в спец-

ифических каротиноид-продуцирующих штаммах *E.coli*, исследование белок-белковых взаимодействий и кинетики процесса передачи каротиноида с помощью биохимических и биофизических методов.

Результаты и выводы. В работе показано, что водорастворимые STDHs эффективно извлекают каротиноиды из мембран, связывая каротиноиды эхинонен и кантаксантин. STDHs демонстрируют большее сродство к каротиноиду, чем индивидуальный С-домен OCP, однако передают каротиноид в апоформу полноразмерного OCP. При этом, будучи неспособными забрать каротиноид у OCP⁰, STDHs принимают каротиноид из фотоактивированного состояния OCP^R, что дает основание предположить принципиально новую роль STDH как модулятора активности OCP.

Д5. Генетически кодируемый pH-сенсор на основе желтого флуоресцентного белка из *Phialidium sp.*

Е.С. Чевокина (lzchv@yandex.ru), В.И. Мартынов, А.А. Пахомов

Лаборатория молекулярной тераностики Института биоорганической химии РАН, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Введение. Желтый флуоресцентный белок из медузы *Phialidium sp.* (phiYFP) имеет максимумы возбуждения и эмиссии флуоресценции при 522 и 537 нм, соответственно. При закислении среды из-за протонирования фенольной группы хромофора белок переходит в спектральную форму, поглощающую при 532 нм. В отличие от ближайшего гомолога зеленого флуоресцентного белка из медузы *Aequorea victoria* (GFP), в phiYFP не происходит процесс переноса протона в возбужденном состоянии (excited state proton transfer, ESPT), в результате чего при уменьшении pH белок становится нефлуоресцирующим.

Материалы и методы. Для создания желтого генетически кодируемого pH-сенсора на основе phiYFP был проведен сайт-направленный мутагенез аминокислотных остатков (а.к.о.) в ближайшем окружении хромофора с целью получить белок с восстановленным ESPT. Полученный белок нарабатывался в клетках *E.coli*, подвергался выделению, очистке и дальнейшему спектральному анализу с последующим титрованием и созданием генетической конструкции для введения в эукариотную клетку.

Результаты. Были получены варианты с заменами а.к.о. в 203, 205 и 65-м положении (нумерация по GFP). Среди всех протестированных вариантов только в мутантном белке phiYFP-T65V наблюдался ESPT. Белок имеет два пика возбуждения флуоресценции при 412 и 516 нм, соответствующие анионной и протонированной форме хромофора соответственно, и один пик эмиссии флуоресценции при 527 нм. В спектрах поглощения наблюдались два основных пика при 516 и 408 нм. Титрованием белка в диапазоне pH от 2 до 12 была установлена pKa равная 7.09, что близко к физиологически нормальному значению pH в клетке.

Выводы. При помощи сайтнаправленного мутагенеза был получен мутантный вариант желтого флуоресцентного белка phiYFP-T65V. Соотношение максимумов возбуждения флуоресценции в синем и зеленом спектральных диапазонах зависит от pH, что позволяет использовать phiYFP-T65V в качестве внутриклеточного ратиометрического pH-сенсора.

Д6. Новая термофильная бактерия, восстанавливающая антрахинон-дисульфонат

В.В. Чистяков (*chistvas@gmail.com*), А.И. Слободкин

Лаборатория разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов, институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН

Введение. Выявление разнообразия биохимических процессов у организмов, живущих в различных условиях, является актуальной задачей современных исследований, поскольку позволяет выявлять фундаментальные механизмы метаболических и регуляторных процессов, а также может быть источником биоинженерных конструкций для практического использования. Микроорганизмы, живущие в экстремальных условиях, являются перспективным объектом таких исследований. Из-за геотермического нагрева земной коры анаэробные термофильные микроорганизмы представляют собой основную часть биоразнообразия подземной биосферы. Антрахинон-дисульфонат – химический аналог гуминовых соединений, являющихся частью рассеянного органического вещества горных пород.

Материалы и методы. Использованы микробиологические методы получения накопительных культур, и выделения чистой культуры с применением техники анаэробного культивирования. Для определения таксономического положения использованы методы анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и результаты секвенирования полного генома.

Результаты. Из наземного грязевого вулкана Таманского полуострова выделена чистая культура умеренно термофильной анаэробной бактерии, восстанавливающая и 9,10-антрахинон 2,6-дисульфонат. Филогенетический анализ указывает на принадлежность нового изолята к филуму *Firmicutes*, класс *Clostridia*. Сходство с ближайшим валидно описанным родственником, *Moorella thermoacetica*, составляет 89%. Построены кривые роста и определены оптимумы роста температуры, pH и солености. Построены филогенетические деревья по гену 16S рРНК и по 120 белкам из полного генома. Анализ полного генома показал наличие путей гликолиза, утилизации пуриновых соединений (пурин, ксантин, гипоксантин и др.), брожения мальтозы и ксилозы.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о наличии в наземных грязевых вулканах, термофильных анаэробных микроорганизмов, способных использовать хиноновые соединения в качестве акцептора электронов, что ранее показано не было. Результаты филогенетического анализа позволяют рассматривать новый изолят как представителя нового рода и вида класса *Clostridia*.

Работа проводится в рамках проекта РФФ 17-74-30025.

Секция «Биохимия»

Б1. Продукция мембранных белков в активном состоянии в бесклеточной системе: поиск новых мембраноподобных сред

Е.В. Васильева (*anflez001@bk.ru*)

Лаборатория биомолекулярной ЯМР спектроскопии ИБХ РАН

Введение. Клеточная экспрессия мембранных белков в клетках бактерий часто сопряжена с токсичностью или с образованием телец включения, при которых белок принимает неправильную структуру. Сейчас большую популярность набирает **бесклетка**, она позволяет использовать мембраноподобные среды, чтобы белок встраивался в это мембраноподобное окружение. Такие системы позволяют легко получать различные варианты изотопно меченых по аминокислотам белков, что позволяет в дальнейшем изучить эти белки с помощью ЯМР. Ключевым компонентом данной системы является мембраномоделирующая среда. На сегодняшний день существует ряд работ по скринингу сред, но данный вопрос остается открытым. Множество сред еще не проверены, а исследованные можно применить в случае лишь некоторых белков, и задача найти более-менее универсальные среды остается открытой. Данная работа посвящена скринингу различных новых сред. Цель: поиск новых сред, которые позволили бы поддерживать структуру мембранных белков в правильной конформации. Для измерения активности бактериородопсина и его правильного фолдинга необходимо в процессе экспрессии добавлять ретиналь. Поэтому необходимо исследовать его влияние на систему.

Материалы и методы. Диализ ставили в специальных реакторах [1], использовали диализные мембраны размером 12,5 кда. Соотношение fm к gm 12 к 1, состав которых представлен в статье [2]. Для подбора условий добавляли разные концентрации магния, калия и ретиналя со спиртом.

Результаты. В процессе подбора калия мы варьировали концентрации каждые 30 мМ, магния каждые 3мМ. Анализ проводили в электрофорезе с полиакриламидным гелем, оценивая по яркости полосы, соответствующей нашему белку на геле после окрашивания. По калию концентрации 0 – 30 – 50мМ давали приблизительно одинаковый выход, и мы решили в силу более простой постановки опытов в будущем проще его вообще не добавлять. Для магния оптимум был при 12-15мМ, для дальнейших исследований было выбрано 15мМ. Кроме того, нами было показано, что ретиналь и этанол в тех количествах, в которых мы добавляли не влияют на экспрессию.

Выводы. Подобраны оптимальные концентрации Mg (15мМ) и K (0мМ). Показано, что исследуемые концентрации транс-ретиналя и этанола не влияют на выход белка.

Список литературы.

1. B. Schneider *et al.*, in *Heterologous Expression of Membrane Proteins*, I. Mus-Veteau, Ed. (Humana Press, Totowa, NJ, 2010), vol. 601, pp. 165–186.
2. E. N. Lyukmanova *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* **1818**, 349–358 (2012).

Б2. Получение рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы человека (L-NEP) в составе гибридной конструкции

Д.С. Калинин^{1,2} (309163@gmail.com), Д.А. Макаров¹, В.Н. Степаненко¹, И.В. Соколова¹, Т.В. Воробьева¹, К.Г. Левандовская¹, Т.Д. Мелихова¹, Е.А. Нокель¹, Е.А. Гордеева¹, А.А. Зинченко¹, И.В. Мягких¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
²Биотехнологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова

Использование гибридных конструкций белков в качестве инструментов для производства биотехнологических продуктов хорошо известно в биофармацевтической промышленности. Эта технология эффективно используется для улучшения экспрессии, растворимости и получения биологически активных белков. Одним из ферментов, используемых для расщепления гибридных конструкций, является легкая цепь энтеропептидазы человека (L-NEP), обладающая высокой специфичностью в отношении пептидной связи Lys(Arg) – X, в составе последовательности Asp₄Lys(Arg) – X. Это позволяет использовать фермент для селективного расщепления гибридных белков, содержащих сайт узнавания L-NEP. Целью нашей работы стала разработка технологии получения L-NEP в составе гибридной конструкции.

Был создан и культивирован штамм *Escherichia coli* BL21, продуцирующий в виде тел включения гибридный белок, состоящий из тиоредоксина, специфического сайта узнавания L-NEP и собственно L-NEP. Тела включения отмывали в присутствии детергентов, содержащийся в них гибридный белок экстрагировали и ренатурировали. Ренатурированный гибридный белок расщепляли, иницируя каскадную реакцию добавлением небольшого количества легкой цепи энтеропептидазы человека. Реакционную смесь, содержащую L-NEP, использовали без дополнительной очистки для получения пуротоксина-6 (PT-6) и интерферона альфа-2b из гибридных белков, состоящих из тиоредоксина, сайта расщепления L-NEP и соответствующих целевых белков. Исследованы условия расщепления этих гибридных белков.

Анализ продуктов гидролиза гибридного белка PT-6, катализируемого L-NEP, с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии, показал, что в широком интервале условий в результате расщепления образуется только целевой продукт PT-6, в то время как расщепление гибридного белка интерферона альфа-2b приводит к высокому выходу целевого продукта только в оптимальных условиях.

Таким образом, в результате исследований был разработан простой технологический процесс получения L-NEP и продемонстрирована возможность использования этого фермента для получения пуротоксина-6 и интерферона альфа-2b.

Б3. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* как модель для поиска митохондриальных разобщителей с максимальным диапазоном нетоксичных эффективных концентраций

С.С. Соколов¹, Н.А. Киреева² (nkomarova.95@gmail.com), Е.А. Смирнова¹, Ф.Ф. Северин¹

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова

²Кафедра биологии почв факультета почвоведения, МГУ им. М.В. Ломоносова

Введение. Рассеивание мембранного потенциала митохондрий с помощью веществ-разобщителей - перспективный способ борьбы с ожирением. Недавно было

показано, что мягкий разобщик S12TRP снижал вес и концентрацию глюкозы в крови мышей, содержащихся на “жирной” диете [1]. Испытание новых мягких разобщиков на мышах является технически трудным и дорогостоящим. В данной работе мы предложили дрожжевую модель, позволяющую подбирать вещества-кандидаты на роль нетоксичных разобщиков.

Для этого мы использовали штамм *delta tps1 S. cerevisiae* в котором нарушен ген, кодирующий трегалозо-6-фосфат-синтазу - белок, ограничивающий скорость гликолиза на первой стадии, образовании глюкозо-6-фосфата. При отсутствии *tps1* и наличии глюкозы, гликолиз становится избыточно активен и его накопившиеся интермедиаты ингибируют рост клеток. В частности, 1,6-фруктозобисфосфат связывается с Cdc25 и через Ras2 ингибирует клеточную пролиферацию. Мягкие разобщики в данной системе активировали клеточное дыхание, что способствовало снижению уровня интермедиатов гликолиза, таким образом, повышая выживаемость клеток.

Материалы и методы. Клетки предварительно подращивали ночь в жидкой среде YPGly без глюкозы. Вещества-разобщики добавляли в различных концентрациях, также добавляли глюкозу до концентрации 0,2%, после чего инкубировали в течение 16-20 часов на термостатируемой качалке (200 об/мин, 30°C). После инкубации клетки раскапывали на чашку пятнами по 10 мкл, на вторые сутки проводили учёт колоний, оценивая эффективность действия добавок.

Результаты. Сравнивая степень влияния различных разобщиков, мы определяли диапазон концентраций, в котором они снижали долю умерших клеток мутанта *delta tps1* в присутствии глюкозы. Получены данные для нескольких веществ.

Выводы. Дрожжевая модель подходит для первого этапа испытаний веществ-разобщиков. Вещества с максимальным диапазоном нетоксичных эффективных концентраций будут предложены для проверки на мышах.

Список литературы.

1. V. Kalinovich *et al.*, *International Journal of Obesity*. **40**, 1864–1874 (2016).

Б4. Исследование процесса переноса протона в ходе фотоцикла бактериородопсина

А.С. Князева (kniazeva.anastasiia.2015@post.bio.msu.ru), Г.А. Армеев, А.К. Шайтан, К.В. Шайтан Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический ф-т, каф. Биоинженерии

Введение. События, происходящие в процессе фотоцикла бактериородопсина, изучены достаточно хорошо: описаны ключевые аминокислоты, образующие цепь переноса протона, получены структуры интермедиатов фотоцикла. Однако недостаточно полно изучен механизм, определяющий возможность и однонаправленность этого процесса. Благодаря появлению структур, полученных при помощи фемтосекундных рентгеновских лазеров, появилась возможность исследовать конформационные перестройки внутри бактериородопсинов в ходе фотоцикла, но разрешение этого метода не позволяет точно определить положение протонов в системе.

Материалы и методы. В работе использовались методы молекулярной динамики (в рамках классических силовых полей) и термодинамического интегрирования для нахождения свободных энергий депротонирования аминокислотных остатков, непосредственно участвующих в процессе переноса протона. Расчеты проводились на структурах, полученных на рентгеновском лазере [1].

Результаты. Были получены значения энергий депротонирования для четырех аминокислотных остатков (Asp 85, Asp 96, Glu 194, Glu 204), участвующих в процессе переноса протона, на разных временах после фотовозбуждения (от 0 до 1,75 мс), что соответствует стадиям фотоцикла от O до M2. Из этих данных рассчитана свободная энергия переноса протона между соседними звеньями в цепи переноса протона, а также предсказано наиболее вероятное положение протона на разных этапах фотоцикла.

Выводы. Полученные результаты дают возможность проследить перемещение протона в ходе фотоцикла бактериородопсина и оценить эффективность переноса на каждом этапе.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-00-00166 и выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

Список литературы.

1. E. Nango *et al.*, *Science*. **354**, 1552–1557 (2016).

Б5. Роль нового трансмембранного модулятора пуриnergического рецептора P2Y1 и рецепторов факторов роста фибробластов – c-Answer в регенерации и развитии мозга у холоднокровных

Д.Д. Короткова^{1,2} (ddkorotkova@gmail.com), А.С. Иванова¹, Н.Ю. Мартынова¹, В.А. Любецкий³, А.В. Селиверстов³, А.М. Нестеренко^{1,4}, М.Б. Терёшина¹, А.Г. Зарайский¹

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

²МГУ имени М.В. Ломоносова

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

⁴Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.

Введение. Ген *c-Answer* был идентифицирован нами совместно с лабораторией математических моделей в биологии (ИППИ РАН) в ходе биоинформатического скрининга геномов представителей всех классов позвоночных, направленного на поиск генов, исчезнувших в эволюции на этапе перехода к теплокровным. Ранее нами были впервые описаны физиологические функции *c-Answer* и установлено его участие в регенерации и развитии мозга шпорцевой лягушки посредством взаимодействия с рецептором пуриnergического сигнального пути - P2Y1 и рецепторами факторов роста фибробластов.

Материалы и методы. Модельный объект – шпорцевая лягушка. Генный нокаут с помощью системы CRISPR/Cas9; нокдаун с помощью антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов (МО), Co-IP с последующим Вестерн блоттингом, ко-инъекции синтетической РНК с Ca²⁺-флуоресцентным сенсором или люциферазным репортером, активируемым MAP/Erk сигнальным путем.

Результаты. В ходе экспериментов с применением репортерных конструкций было установлено, что *c-Answer* оказывает стимулирующее действие на пуриnergический и Fgf сигнальные пути. Взаимодействие *c-Answer* с рецепторами P2Y1 и FGFRs в разной степени осуществляется всеми доменами белка, однако основную роль играет трансмембранный. Морфологические эффекты, полученные в результате инъекций делеционного мутанта *c-Answer*, содержащего внутриклеточную и трансмембранную части, совпадают с эффектами подавления функции *c-Answer* с помощью MO или CRISPR/Cas9 (уменьшение или аномалии головных структур, ингибирование регенерации конечностей). Эффекты от инъекций мутанта, содержащего внеклеточную и трансмембранную части - противоположны и совпадают с эффектами оверэкспрессии *c-Answer* дикого типа.

Выводы. Трансмембранный белок *c-Answer* регулирует регенерацию и развитие мозга холоднокровных путем стимуляции пуриnergического и Fgf сигнальных путей. Исчезновение *c-Answer* в эволюции у предков теплокровных животных могло быть одной из причин потери способности к регенерации конечностей и могло привести к созданию условий для прогрессивного развития головного мозга в результате изменения активности данных каскадов.

Б6. Регуляция пиридоксалькиназы человека тиаминтрифосфатом

*Д.В. Крюков (dmvlkry@belozersky.msu.ru), В.А. Алешин, В.И. Бунин
НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, отдел биокинетики, группа биохимической инженерии*

Введение. Пиридоксалькиназа (ПЛК) катализирует образование пиридоксаль-5'-фосфата (ПДФ) из пиридоксаля (ПЛ, витамин B6) и АТФ, участвуя в регуляции активности многочисленных ПДФ-зависимых ферментов, вовлечённых, в частности, в метаболизм аминокислот, синтез нейротрансмиттеров, гликогенолиз. Тиамин (витамин B1) в виде кофермента тиаминдифосфата (ТДФ) необходим для метаболизма углеводов, жиров и аминокислот. Недавние исследования показали ингибирование ПЛК тиамином конкурентно по отношению к ПЛ и ТДФ конкурентно по отношению к АТФ [1]. Целью данной работы является изучение регуляции рекомбинантной человеческой ПЛК некоферментной формой тиаминтрифосфатом (ТТФ).

Материалы и методы. Рекомбинантная ПЛК человека любезно предоставлена М. ДиСальво (Университет Рима, Италия) [2]. ТТФ синтезирован по опубликованному методу [3]. Кинетический анализ влияния тиаминтрифосфата и его фосфатов на скорость ПЛК реакции проведён в средах, содержащих 0,07 мМ Zn^{2+} (Na_2ATP ; KH_2PO_4 pH=6) или Mg^{2+} ($MgATP$; NaBES pH=7.3). Скорость реакции измеряли по поглощению продукта реакции ПЛК с максимумом при длине волны 388 нм.

Результаты. Насыщение ПЛК АТФ аппроксимируется двухцентральной моделью связывания АТФ лучше, чем моделью Михаэлиса-Ментен. Исследование в системе с 0,07 мМ Zn^{2+} показало, что ТТФ (0.1-0.5 мМ) активировал ПЛК при концентрации АТФ до 0.4 мМ. В среде с Mg^{2+} ($MgATP$), напротив, ТТФ (0.1-0.5 мМ) ингибировал при концентрации АТФ 0.2 - 0.4 мМ и активировал ПЛК при АТФ 1.8 мМ. Сравнение действия на ПЛК тиаминтрифосфата и его моно-, ди- и трифосфатов показывает, что активация ПЛК ТТФ связана с наличием трифосфатной группировки.

Выводы. Впервые обнаружен специфический активирующий эффект некоферментного производного витамина B1 - ТТФ - на функцию ПЛК, синтезирующей коферментное производное витамина B6 - ПЛФ. Данная активация свидетельствует об аллостерической регуляции ПЛК ТТФ.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 18-54-7812 и РФФИ № 18-34-00235.

Список литературы.

1. G. Mkrtchyan *et al.*, *Scientific Reports*. 5 (2015), doi:10.1038/srep12583.
2. M. L. di Salvo, S. Hunt, V. Schirch, *Protein Expr. Purif.* 36, 300–306 (2004).
3. L. Bettendorff, H. O. Nghiêm, P. Wins, B. Lakaye, *Anal. Biochem.* 322, 190–197 (2003).

Б7. Исследование белка р61-59 бактериофага 24В

А.С. Кузнецов^{1,2} (alexbluesking@gmail.com), А.В. Лепаров², П.А. Иванов², Е.Е. Куликов²

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра вирусологии

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, лаборатория вирусов микроорганизмов

Введение. Программируемый сдвиг рамки считывания (programmed ribosomal frameshifting, PF) — нуклеотидная последовательность, которая с некоторой вероятностью вызывает “соскальзывание” транслирующей рибосомы на один или два нуклеотида назад, переключая рамку считывания РНК матрицы. Использование PF позволяет создавать на стадии трансляции альтернативные варианты белка, отличающиеся С-концевой областью. PF присутствует в генах шаперонов хвоста (т.н. G/GT гены) многих хвостатых бактериофагов. Умеренный хвостатый бактериофаг 24В, инфицирующий клетки *Escherichia coli*, не имеет белков типа G/GT, однако содержит в своем геноме последовательность с потенциально возможным участком сдвига рамки между генами 61 и 59. Эти гены кодируют потенциальные белки, связывающиеся с рецептором бактериальной клетки. Целью данной работы является проверка функциональности предполагаемого сайта программируемого фрейм-шифтинга.

Материалы и методы. В рамках цели данной работы экспрессионную плазмидную конструкцию, содержащую перекрывающиеся гены 61 и 59 с GST – тагом, введенном на N-конце гена 61. Для этого участок ДНК бактериофага 24В, включающий гены 61 и 59, амплифицировали с помощью ПЦР. Далее этот фрагмент подвергли гидролизу рестриктазами EcoRI и XhoI и лигировали с обработанным этими же рестриктазами вектором рGEX4Т3. Эту конструкцию использовали для трансформации культуры *E. coli* штамма BL21(DE3). После лизирования клеток, подвергнутых методу экспрессии, получили препарат тотального белка, который нанесли на полиакриламидный гель для анализа методом вертикального электрофореза.

Результаты. Получили трансформантов по соответствующей конструкции, а также векторам рGEM и рGEX как отрицательный и положительный контроль экспрессии. Методом вертикального электрофореза в ПААГ мы обнаружили у опытных трансформированных клеток новый белковый продукт, молекулярная масса которого составляет около 100кДа.

Выводы. Молекулярная масса рекомбинантного белкового продукта, обнаруженного нами на электрофорезе, вероятно, соответствует теоретически рассчитанной

молекулярной массе белка р61-59, для которого в процессе трансляции имел бы место программируемый фреймшифтинг.

Б8. Липоксигеназы микроорганизмов: распространение и функции

Г.Ф. Куракин¹, А.М. Самоукина²

¹ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, лечебный факультет

²ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии

Введение. Липоксигеназы – это ферменты, катализирующие перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот. Основная их функция в организмах у грибов, растений и животных состоит в продукции сигнальных веществ, координирующих процессы размножения, развития и ответа на повреждение. Липоксигеназы присутствуют у бактерий и простейших, однако их функции у данных организмов остаются неизвестными. Целью исследования является изучение филогенетического и таксономического распространения липоксигеназ и выявление связи с экофизиологическими особенностями соответствующих микроорганизмов.

Материалы и методы. Проводился поиск вероятных липоксигеназ в протеомах бактерий и простейших по гомологии с помощью программ BLAST NCBI и BLAST UniProt. Для валидации результатов поиска использовались литературные данные о функционально активных (литературные данные) и консервативных (данные сервера ConSurf) аминокислотных остатках липоксигеназ. Для построения и анализа филогенетических деревьев использовались серверы COBALT и iTOL.

Результаты. Среди бактерий на первом месте по частоте встречаемости липоксигеназ располагается филум Cyanobacteria и порядок Mucosoccales. Принадлежащие их представителям липоксигеназы формируют крупные обособленные филогенетические группы на эволюционных деревьях. Среди простейших лидирует класс Mucetozoa, также образуя обособленную ветвь филогенетического дерева. Для трёх данных таксонов таксонов характерно образование многоклеточных структур. Можно предположить связь наличия липоксигеназ и тенденции к многоклеточности.

Среди оставшихся видов бактерий липоксигеназы встречаются преимущественно у оппортунистических патогенов с широким кругом хозяев, а также симбионтов растений. Механизм связи липоксигеназ и патогенности описан в литературе для *Pseudomonas aeruginosa*, однако результаты проведенного исследования позволяют возможным предполагать более широкое распространение данных взаимосвязи среди условно-патогенных бактерий, а также на бактерий-фитосимбионтов.

Выводы. Таким образом, таксономическое и филогенетическое распространение липоксигеназ бактерий и простейших позволяет предполагать их функциональную взаимосвязь с многоклеточностью, оппортунистической патогенностью и фитосимбиозом.

Б9. Стереоселективный синтез производного бромтриптофана для твердофазного пептидного синтеза

М.А. Ландау^{1,2}(marusyalandau@gmail.com), Д.А. Сенько^{1,2}, И.А. Иванов¹

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

² МГУ имени М.В. Ломоносова

Бромирование остатка триптофана является распространённой посттрансляционной модификацией белков у морских организмов. Эта модификация характерна для кателицидинов миксин и некоторых антибактериальных пептидов из гемоцитов асцидий, лейкоцитов морских ежей и аннелид, а также для некоторых конотоксинов и контрифанов, выделенных из яда морских улиток рода *Conus*. Для последних двух групп пептидов показаны ярко выраженные физиологические эффекты, однако остаются малоизученными их бромированные аналоги, что связано со сложностью получения L-6-бромтриптофана для использования в пептидном синтезе. На данный момент известны энзиматический метод синтеза L-6-бромтриптофана и метод разделения диастереомеров. Нами был опробован метод прямого синтеза из L-триптофана.

Полученные соединения анализировались при помощи масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением на приборе Thermo Scientific LCQ Deca XP Plus, спектры ЯМР регистрировались на приборах Bruker Avance III 600 и 700 мГц. Реагенты были получены у местных поставщиков и использованы без дополнительной очистки.

В результате разработан метод прямого синтеза Fmoc-L-6-бромтриптофана из L-триптофана. Метод включает восемь стадий с одной хроматографической очисткой на стадии получения полностью защищённого бромтриптофана. Ключевой стадией синтеза является диазотирование по Филимонову в ацетонитриле с образованием диазониевой соли между нитрат-ионом и аминогруппой защищённого 6-аминотриптофана, который может быть легко получен из продукта реакции селективного нитрования L-триптофана в шестое положение. Последующее деблокирование и введение Fmoc-защиты по N_α-аминогруппе являются завершающими стадиями синтеза Fmoc-L-6-бромтриптофана.

На данный момент описанный метод является наиболее удобным вариантом прямого синтеза Fmoc-L-6-бромтриптофана из L-триптофана. Продукт может быть использован в твердофазном пептидном синтезе для получения бромтриптофан-содержащих пептидов.

Б10. Эндогенный формальдегид человека как противоопухолевый метаболит: методы количественной оценки его содержания в раковой опухоли

Ф.А. Липскеров (fedor@lipskerov.ru)

МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химии природных соединений

Введение. Эндогенный формальдегид (ФА) является одним из нормальных метаболитов, образующихся в результате биохимических процессов в живых организмах. С другой стороны, клетки злокачественной опухоли характеризуются

повышенным уровнем образования эндогенного ФА, что сопровождается компенсаторным повышением активности альдегиддегидрогеназ, обеспечивающих его клеточный клиренс. Нами предложен метод антираковой терапии, когда снижение активности альдегиддегидрогеназ приводит к резкому повышению ФА в клетке и последующему ее апоптозу или некроптозу. Для практического использования такой терапии необходимо разработать метод, позволяющий точно и воспроизводимо измерять концентрацию ФА в различных биологических образцах человека. В данной работе я провел модификацию и оптимизацию метода измерения ФА в биологических образцах.

Материалы и методы. Для определения концентрации ФА использовался метод, основанный на его дериватизации с помощью ацетоацетанилида по механизму Ганча, с последующим измерением флуоресценции продукта на спектрофотометре.

Результаты. Проведенное исследование позволило разработать метод количественной оценки содержания ФА как в биологических жидкостях, так и в экстрактах раковой опухоли. Разработанный мною метод применим для измерения ФА с помощью флуоресценции в микрообъемах крови и других биологических жидкостях. Оказалось, что компоненты сыворотки крови млекопитающих не влияют на результат измерений. Более того, разработанный метод позволяет определять концентрацию ФА без дополнительной предварительной подготовки биологических образцов, т.е. без потери исследуемого вещества. Данный метод не требует нагревания и строгого соблюдения pH в исследуемой пробе, что является немаловажным при работе с различными биологическими образцами.

Вывод. Разработан метод количественной оценки содержания ФА в биологических образцах. Метод основан на реакции Ганча с использованием ацетоацетанилида, но применим для определения эндогенного ФА непосредственно в биологических образцах человека и млекопитающих.

В11. Интерлейкин-4 предотвращает развитие инсулинорезистентности и активирует STAT6 и Akt-зависимые сигнальные пути в адипоцитах 3T3-L1

С.С. Мичурина^{1,2} (svetlana_michurina@rambler.ru), Ю.С. Стафеев¹, И.Б. Белоглазова¹, Ю.Д. Молокотина¹, Н.В. Подкуйченко^{1,2}, Е.С. Зубкова¹, Е.К. Шевченко¹, А.В. Воротников^{1,2}, М.Ю. Меньшиков¹, Е.В. Парфёнова^{1,2}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии МЗ РФ

² МГУ имени М.В. Ломоносова

Введение. По данным Всемирной организации здравоохранения сахарный диабет второго типа (СД2Т) в настоящее время приобретает характер эпидемии. Это заболевание характеризуется повышенным уровнем глюкозы в крови, возникающем вследствие снижения чувствительности клеток к инсулину (инсулинорезистентности – ИР).

Одним из факторов риска развития СД2Т является ожирение. Большое количество экспериментальных и клинических данных свидетельствует о важной роли воспаления в возникновении ИР. В исследованиях последних лет было обнаружено

положительное влияние противовоспалительного цитокина ИЛ-4 на инсулиновую чувствительность в животной модели. В нашей работе мы изучаем некоторые внутриклеточные механизмы его действия.

Методы. Исследования проводили на зрелых адипоцитах, полученных из клеток линии 3T3-L1. Клетки обрабатывали рекомбинантным ИЛ-4 (50 нг/мл) или трансдуцировали геном ИЛ-4. В полученных клетках индуцировали ИР с помощью пальмитиновой кислоты (300 мкМ). Затем анализировали чувствительность адипоцитов к инсулину: методом иммуноблоттинга измеряли фосфорилирование белков инсулинового каскада и оценивали поглощение радиоактивно-меченой глюкозы. Методом конфокальной микроскопии определяли ядерную транслокацию транскрипционного фактора STAT6 под действием ИЛ-4.

Результаты. Рекомбинантный и генетически кодируемый ИЛ-4 предотвращает снижение фосфорилирования белков инсулинового каскада после индукции ИР пальмитиновой кислотой в адипоцитах. Кроме того, инкубация с ИЛ-4 в течение 24ч увеличивает поглощение ³H-2-дезоксиглюкозы зрелыми адипоцитами. Воздействие ИЛ-4 в течение 1ч вызывает быструю транзиторную активацию STAT6, белка субстрата инсулинового рецептора IRS1 и Akt в адипоцитах.

Выводы. Мы обнаружили, что ИЛ-4 способен оказывать влияние на изолированные адипоциты 3T3-L1, а именно активировать некоторые инсулин-зависимые процессы в адипоцитах. Триггерами этих процессов может служить наблюдаемая активация STAT6 или белка IRS1. Дальнейшие исследования внутриклеточных механизмов, регулируемых ИЛ-4 в адипоцитах, позволят более полно понять механизмы влияния воспаления на ИР и предложить противовоспалительные подходы к терапии СД2Т.

В12. Моделирование гидролиза субстрата Dabcyl-KQ₅GD-EDANS субъединицами 20S протеасомы

А.А. Морозов (a.a.morozov.fbb@yandex.ru), А.В. Бачева

МГУ имени М.В. Ломоносова, лаборатория химии белка кафедры химии природных соединений

Введение. Протеасома – это мультисубъединичный комплекс, встречающийся во всех клетках эукариот и некоторых архей. Различают конститутивные и иммунопротеасомы. Основная роль конститутивных протеасом – гидролиз неправильно фолдированных, поврежденных или отработанных белков. Сборка иммунопротеасом начинается в ответ на воздействие провоспалительных цитокинов, например γ -интерферона. Её основная функция – производство пептидов для передачи комплексу МНС I. Каталитическими являются субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$, а также $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ в иммунопротеасоме, имеющие различную субстратную специфичность: $\beta 1$ – каспазную, $\beta 1i$ – химотрипсин-подобную, $\beta 2/\beta 2i$ – трипсин-подобную, $\beta 5/\beta 5i$ – химотрипсин-подобную. Известно, что эукариотическая протеасома плохо справляется с гидролизом поли-Q последовательностей в белках, что может приводить к таким нейродегенеративным заболеваниям, как болезнь Хантингтона. Изучив структурные данные о строении карманов связывания β -субъединиц, мы предположили, что именно субъединица $\beta 1$ должна гидролизовать поли-Q участки с наибольшей продуктивностью.

Цель данной работы – изучить эффективность протекания гидролиза субстрата Dabcyl-KQ₅GD-EDANS в различных субъединицах протеасомы, используя компьютерное моделирование.

Материалы и методы. Докинг выполнен в программе AutoDockVina 1.1.2. Структура лиганда нарисована в программе MarvinSketch v16.12.19. Докинг проводили в активные центры каталитических субъединиц протеасомы, структуры взяты из базы данных PDB (PDB ID конститутивной протеасомы: 3UNE, иммунопротеасомы: 3UNH). В каждую субъединицу было произведено по 11 докингов. Результаты анализировали с помощью программы PyMol V2.0.0.

Результаты. В качестве результатов для каждой из субъединиц получено 99 pdb-файлов, содержащих различные варианты расположения субстрата Dabcyl-KQ₅GD-EDANS в активном центре. Обнаружено, что продуктивное связывание наблюдается в 25% случаев для субъединицы $\beta 1c$ и 13% для субъединицы $\beta 1i$.

Выводы. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что субъединица $\beta 1c$ гидролизует поли-Q участки с большей продуктивностью, чем другие субъединицы.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-01446.

Б13. Получение быстрой скелетной изоформы тропонина I и ее идентификация в скелетных мышцах

А.Д. Гончар¹ (goncharad@gmail.com), А.М. Николаева¹ (annanikolaeva.msu@gmail.com), Н.А. Медведева², М.М. Артемьева², Н.Б. Свиридкина², Е.П. Альтишулер¹, А.П. Богомолова¹

¹кафедра биохимии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

²кафедра физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Введение. Тропонин I (TnI) – белок сократительного аппарата клетки. В организме человека TnI представлен тремя изоформами: сердечной и двумя скелетными, быстрой и медленной. Скелетные изоформы экспрессируются в быстрых и медленных мышечных волокнах, соответственно, при этом их соотношение в различных мышцах отличается и варьирует при некоторых патологиях. Идентификация скелетных изоформ тропонина I в мышцах модельных животных с использованием антител может быть удобным методом дифференцирования разных типов мышечных волокон и оценки их соотношения.

Целью нашей работы являлось выделение быстрой скелетной изоформы тропонина I (fsTnI) крысы и ее идентификация в скелетной мышечной ткани.

Материалы и методы. В качестве стандарта для исследования нативного fsTnI крысы использовали рекомбинантный fsTnI человека (rec hfsTnI, идентичность последовательности 98%). Его получали в клетках *E. coli* штамма Rosetta 2(DE3) pLysS. Очистку rec hfsTnI из клеточного лизата проводили методом ионообменной хроматографии FPLC на носителе MonoS. Нативный fsTnI крысы выделяли из экстракта скелетных мышц задних конечностей крысы методом аффинной хроматографии. Для выделения и идентификации нативного fsTnI крысы использовали антитела к rec hfsTnI, полученные в лаборатории ранее. Антитела, специфичные к разным участкам последовательности fsTnI, конъюгировали с сепарозой и проверяли их взаимодействие с нативным белком крысы методом иммунопреципитации. Нали-

чие fsTnI в элюате подтверждали методами электрофореза и вестерн-блоттинга. Антитела, специфично детектирующие нативный fsTnI крысы, использовали для иммуногистохимического окрашивания скелетной мышечной ткани крысы.

Результаты. Были получены препараты rec hfsTnI и нативного fsTnI крысы. Были подобраны антитела, специфичные к белку человека, которые могут узнавать белок крысы. При окрашивании этими антителами срезов скелетной мышечной ткани крысы наблюдали специфическое окрашивание сократительного аппарата.

Выводы. Был разработан метод идентификации fsTnI в скелетной мышечной ткани крысы.

В14. Изучение структурного взаимодействия между нейротрофиновым рецептором p75 и фактором TRAF6

А.И. Оболенский (Andrey1111199@yandex.ru)

Лаборатория биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН

Введение. Нейротрофины (nerve growth factor(NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT3), neurotrophin-4 (NT4)) передают сигнал через низкоаффинный рецептор p75 принадлежащий к надсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNF рецепторы), тем самым регулируя апоптоз, а также процессы развития и деления нервных клеток. Однако не смотря на хорошую изученность самих факторов, механизм передачи сигнала с помощью p75 до сих пор остается неясным. Для ранее предполагавшейся модели функционирования по принципу «щипцы для устриц» (snailtong) в последних работах было показано несоответствие реальным данным ввиду неструктурированности внутриклеточного домена. Возможным объяснением этого противоречия является необходимость для придания жесткости домену в адаптивном факторе TRAF6, для которого показано взаимодействие с внутриклеточным доменом p75. Изучение такого влияния и стало задачей этой работы.

Материалы и методы. TRAF_T домен (319 - 504 аминокислоты) и TRAF_C домен (368 - 504 аминокислоты) человеческого TRAF6 были клонированы в плазмиду pGEMEX для прямой экспрессии и в виде гибрида с N-терминальным SUMO белком для увеличения растворимости и C-терминальным His6. Конструкции трансформировались в E. coli BL21(BE3) pLysS, культуры выращивались на обедненной среде M9 при температурах 13°C, 22°C, 37°C и индуцировались 0; 0,5; 0,25; 1 mM IPTG.

Очищение и выделение проводилось при 4°C. Хроматография на колонке Chelating sepharose HP (GE) с добавлением 0,1% Triton X-100 в лизирующий буфер.

Результаты. Оптимальными условиями для получения максимального выхода растворимых белков TRAF_T и TRAF_C оказалось выращивание при минимальной температуре 13°C, ввиду их низкой растворимости, и индукция 0,25 mM IPTG. Хроматография с Triton X-100 не показала увеличение растворимости для TRAF_T, что связано с низкой стабильностью белка.

Выводы.

1. Получены экспрессионные конструкции для прямых и гибридных белков с TRAF_C и TRAF_T доменами.

2. Для полученных конструкций были найдены оптимальные условия для экспрессии.

Б15. Исследование свойств трифенилфосфониевых аналогов хлорамфеникола

Ю.А. Павлова (julidev@yandex.ru)

МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет

Введение. Хлорамфеникол является антибиотиком с широким спектром действия. Известно, что связывание многих антибиотиков находится в рибосомном туннеле (РТ). Устойчивость бактерий к антибиотикам обеспечивают модификации нуклеотидных остатков рРНК и аминокислотных остатков белков, формирующих стенки РТ. Элементы РТ способны взаимодействовать с пептидами, попадающими извне. Производные хлорамфеникола с заменой дихлорацетильного остатка представляет собой интерес как потенциальные молекулярные зонды для изучения РТ, а также как новые антибактериальные препараты.

Материалы и методы. В данной работе синтетическим путем была получена серия новых аналогов хлорамфеникола, в структуре которых дихлорацетильный остаток заменен на алкилтрифенилфосфоний. Известно, что производные трифенилфосфония обладают антибактериальным действием за счет снижения потенциала на бактериальной мембране. Однако производные трифенилфосфония могут откачиваться из клеток бактерий помпами множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Нами исследована антибиотическая активность трифенилфосфониевых аналогов хлорамфеникола в отношении грамположительных бактерий *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, и *Mycobacterium sp.*, а также грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*. Было проверено влияние помп МЛУ, имеющих в своем составе белок наружной бактериальной мембраны TolC, на резистентность бактерий *E. coli* в присутствии аналогов хлорамфеникола.

Результаты. По результатам тестирования соединений в двойной репортерной системе pDualrep2 показано, что механизм действия трифенилфосфониевых аналогов, подобно хлорамфениколу, связан с остановкой трансляции.

Выводы. Трифенилфосфониевые аналоги хлорамфеникола эффективны в отношении грамположительных бактерий *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, и *Mycobacterium sp.*, а также грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*. Для соединения SAM-C10-TRP обнаружено, что оно выкачивается в основном за счет помпы AcrAB-TolC. Установлено, что механизм антибактериального действия трифенилфосфониевых аналогов хлорамфеникола основан на снижении мембранного потенциала клеток и остановке трансляции.

В16. Получение рекомбинантного растворимого домена неприлизина человека в эукариотической экспрессионной системе Expi293F и исследование расщепления под его действием различных форм натрийуретического пептида типа В человека

*Д.А. Адашева (nesterova.darya97@gmail.com), Р.И. Раевский, А.Г. Семенов, Д.В. Серебряная
Кафедра биохимии биологического факультета, МГУ им. М.В. Ломоносова*

Введение. Неприлизин - пептидаза, участвующая в деградации натрийуретического пептида типа В (BNP, 32 аа). BNP представлен в крови в форме непротессированного предшественника proBNP (120 аа), в полноразмерной форме и в виде протеолитических фрагментов (5-32 и др.). Повышение концентрации BNP является маркером сердечной недостаточности (СН). При лечении СН используется препарат Entresto™, включающий ингибитор неприлизина. Следствием использования этого препарата является изменение концентрации BNP в крови, не отражающее состояние миокарда, что затрудняет использование BNP в диагностике. Целью данной работы было исследование чувствительности различных участков BNP и его форм к расщеплению под действием неприлизина для оценки влияния ингибирования неприлизина на результаты измерения концентрации BNP с использованием различных иммуноэссеев.

Материалы и методы. Была получена молекулярно-генетическая конструкция для экспрессии рекомбинантного растворимого домена неприлизина человека с тагом, содержащим последовательность, узнаваемую антителами 24С5. Экспрессию проводили в эукариотических клетках Expi293F. Очистку проводили на аффинном носителе с иммобилизованными антителами 24С5. Определение сайтов расщепления BNP осуществляли с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии (МС). Формы BNP 1-32, 5-32 и гликозилированный proBNP инкубировали с неприлизином в течение различных промежутков времени и анализировали иммунореактивность BNP с помощью иммунофлуоресцентного анализа сэндвич-типа (4 иммуноэссея).

Результаты. Получен каталитически активный неприлизин человека, выход составил 120 мг/л. Специфичность расщепления BNP по результатам МС соответствует данным литературы. Стабильность эпитопов BNP к расщеплению под действием неприлизина уменьшается в ряду: 5-13 > 27-32 > 11-17 > 15-22 (% деградации после 30 минут инкубации составил 7, 10, 22 и 50, соответственно). Скорость деградации (V_{max}) BNP 5-32 в 2,5 раза выше, чем для BNP 1-32. Форма proBNP нечувствительна к расщеплению неприлизином и не оказывает ингибирующего эффекта.

Выводы. Различная стабильность эпитопов BNP к расщеплению неприлизином позволяет сделать предположение о неприменимости иммуноэссеев, использующих антитела, специфичные к неприлизин-чувствительным эпитопам BNP, для оценки состояния миокарда при лечении СН ингибиторами неприлизина.

В17. Изучение биохимических свойств сывороточного амилоида А человека

П.А. Руденко (*polinarude@yandex.ru*)

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биохимии

Сывороточный амилоид А (САА) относится к белкам острой фазы воспаления: концентрация САА в крови значительно увеличивается после возникновения воспалительного стимула. САА является аполипопротеином и присутствует в крови преимущественно в составе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП).

Функция САА в организме до сих пор неизвестна. Для изучения функции необходим препарат очищенного САА, однако выделение гомогенного препарата САА из крови человека осложнено присутствием нескольких изоформ САА и их протеолитических фрагментов. Целью данной работы было получение очищенного препарата первой изоформы рекомбинантного САА человека (рекСАА1) и исследование возможности его использования в качестве модели для изучения функций САА.

Экспрессию рекСАА1 проводили в клетках *E. coli*. РекСАА1 содержался во фракции растворимых клеточных белков. Уровень продукции рекСАА1 составил 450 мг/л клеточной культуры.

Очистку рекСАА1 из лизата клеток проводили методом аффинной хроматографии на носителе с иммобилизованными моноклональными антителами, специфичными к САА человека. Идентичность рекСАА1 подтверждали методом иммуноблоттинга с использованием моноклональных антител, специфичных к САА человека, а также методом MALDI масс-спектрометрии. Чистота полученного препарата рекСАА1 составила >95%. Выход рекСАА1 после очистки составил 350 мг/л клеточной культуры.

Для того, чтобы проверить, способен ли рекСАА1 встраиваться в ЛПВП подобно эндогенному САА, методом гель-фильтрации сравнивали подвижность эндогенного САА из плазмы больных с воспалением и рекСАА1, разведенного в плазме крови, не содержащей эндогенного САА. Как и эндогенный САА, рекСАА1 находился в плазме крови преимущественно в составе ЛПВП.

В результате работы был получен гомогенный препарат рекСАА1 человека. Показано, что рекСАА1 способен встраиваться в ЛПВП подобно эндогенному САА, что позволяет использовать полученный рекомбинантный белок для изучения функций САА человека.

В18. Разработка методов выделения эндогенных гликопротеинов, ассоциированных с беременностью (PAGs)

Н.С. Рябкова (*n.ryabkova@gmail.com*)

МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биохимии

Гликопротеины, ассоциированные с беременностью (Pregnancy Associated Glycoproteins, PAGs) – семейство белков, экспрессирующихся у млекопитающих отряда Парнокопытные в особых клетках трофобласта плаценты. Показано, что эти белки играют важную роль в качестве информационных посредников между плодом и организмом матери. Изучение профиля экспрессии этих белков в течение цикла беременности важно для понимания механизмов регуляции процессов, протекающих на разных стадиях развития плода.

Целью данной работы была разработка метода выделения PAGs из клеток трофобласта плаценты. Состав полученных препаратов анализировали с помощью метода LC MS/MS.

Описанный в литературе метод выделения PAGs основан на способности этих белков связывать специфических ингибитор аспартиновых протеаз пепстатин. При очистке фракции PAGs на носителе Пепстатин-А-агароза вместе с целевыми белками соосадились большое количество белков примесных белков. Всего в элюате было идентифицировано 85 белков, из которых определено 8 белков PAGs (PAG 2,4,6,8,10,11,15,16). Однако, какое-то количество PAGs осталось во фракции белков, не связавшихся с носителем. Более обогащенный целевыми белками препарат удалось получить при выделении PAGs на ионообменном носителе Blue Sepharose (BS), а также на носителе с иммобилизованными антителами, специфичными к PAGs (CPM101-Sepharose).

Показано, что во фракциях, не связавшихся с носителями BS и CPM-101, белки семейства PAGs отсутствуют. В элюате с носителя BS методом LC MS/MS идентифицировано 157 белков, среди которых обнаружены PAGs 2,6,7,9,10,16,17,18,19,21. В элюате с носителя CPM101-Sepharose идентифицирован 221 белок, среди которых обнаружены PAGs 1,2,3,4,5,6,7,9,14,15,16,17,18,19,20,21.

Таким образом, наиболее широкой специфичностью к разным белкам семейства PAGs обладает носитель с иммобилизованными моноклональными антителами. Разработанные методы выделения PAGs предполагается использовать для изучения профиля экспрессии этих белков на разных этапах беременности парнокопытных.

В19. Изучение ингибирующего действия новых анионных производных фуллерена C₆₀ на активность интегразы ВИЧ-1

М.О. Силкина (mariasilkina1998@mail.ru)

МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химии природных соединений, лаборатория нуклеиновых кислот

Введение. ВИЧ-инфекция, одна из самых масштабных эпидемий конца XX – начала XXI века, вызывается вирусом иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1), который поражает иммунную систему организма.

Стадия интеграции вирусной ДНК в клеточную – одна из ключевых в репликативном цикле ВИЧ-1, поэтому катализирующий ее вирусный фермент – интеграза (ИН) считается одной из самых привлекательных мишеней для создания ингибиторов ВИЧ-1.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании эффективности новых производных фуллеренов в качестве ингибиторов интегразы ВИЧ-1.

Материалы. Ферменты: интеграза, рекомбинантный препарат; плазмида pET15B; T4-полинуклеотидкиназа. Олигонуклеотиды: U5B (5'-GTGTGGAAATCTCTAGCAGT3') и U5A (5'-ACTGCTAGAGATTTTCACAC-3'). Фуллерены – 6 различных анионных производных фуллерена C₆₀.

Методы. 5'-³²P-фосфорилирование олигонуклеотидов, выделение 5'-³²P-фосфорилированных дуплексов, определение активности интегразы ВИЧ-1, электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.

Результаты. Производные фуллерена C₆₀ были протестированы для того, чтобы оценить их ингибирующую активность в интервале концентраций от 10 до 500 нМ. Реакцию 3'-процессинга проводили в течение 2 ч. при температуре 37°C. Продукты реакции анализировали при помощи гель-электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Были получены электрофореграммы, которые были проанализированы с помощью программы Quantity One™ 4.6.6. Была определена эффективность реакции 3'-процессинга, и на основании полученных данных построены графики ингибирования – зависимости эффективности 3'-процессинга от концентрации ингибитора. Также рассчитаны значения концентрации полумаксимального ингибирования IC₅₀ – концентрация ингибитора, при котором эффективность 3'-процессинга снижается вдвое. Расчеты проводили при помощи программы GraphPad Prism 7.

Выводы.

1. Обнаружено, что новые анионные производные фуллерена C₆₀ эффективно ингибируют интегразу ВИЧ-1 в реакции 3'-процессинга.
2. Для всех исследуемых соединений определены значения IC₅₀. Наибольшую активность проявило соединение F31, IC₅₀ для него составила 24,9±5,9 нМ.

В20. Влияние окисления и гликирования на взаимодействие ГАФД с РНК: компьютерное моделирование и эксперименты *in vitro*

И.А. Скаков¹, П.И. Семенюк²

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, vanya.skakov@yandex.ru

²НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, отдел биохимии животной клетки

Введение. Глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), один из ключевых ферментов гликолиза, также имеет множество дополнительных функций в клетке: он участвует в регуляции апоптоза, аутофагии, везикулярного транспорта в процессе эндоцитоза и метаболизма гема. Помимо этого, было показано, что ГАФД связывается с нуклеиновыми кислотами. На основе экспериментальных исследований предполагается, что взаимодействие с РНК происходит вблизи каталитического центра фермента, однако достоверно сайт связывания РНК и ДНК не известен. Взаимодействие ГАФД с РНК меняется после посттрансляционных модификаций белка, таких как окисление и, предположительно, гликирование.

Материалы и методы. В данной работе мы провели компьютерное моделирование взаимодействия ГАФД в нативной, окисленной и гликированной формах с РНК. На первом этапе проведён слепой докинг молекулы РНК к нативной ГАФД с использованием программ NPDock, ZDock и PatchDock. Для лучших находок была запущена симуляция молекулярной динамики на суперкомпьютере «Ломоносов». Затем фермент был модифицирован: остатки цистеина окислены до цистеиновой кислоты, остатки лизина вблизи сайта связывания РНК заменены остатками карбоксиметиллизина (одна из модификаций при гликировании). Для этих структур также проведена симуляция молекулярной динамики.

Помимо этого, экспериментально подтверждено влияние гликирования на активность фермента: ГАФД инкубировался при комнатной температуре в присутствии гликирующих агентов: фосфогицеральдегида (1mM) и метилглиоксала (0.2 и 1 mM). Зафиксированы ранние (по количеству модифицированных остатков лизина и аргинина) и поздние (по флуоресценции) продукты гликирования. Для определения константы связывания ГАФД с РНК использовался метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Результаты и выводы. Определён механизм и сайт связывания ГАФД с РНК. Связывание РНК с ГАФД происходит в главной бороздке фермента, вблизи каталитического центра и обеспечивается полярными взаимодействиями между сахарофосфатным остовом и азотистыми основаниями РНК и заряженными боковыми цепями аминокислот белка.

Показано, что модификации ГАФД влияют на связывание РНК: влияние окисления незначительно, в то время как гликирование ухудшает связывание, что подтверждают эксперименты.

Б21. Влияние содержания азота на уровень экспрессии гена салицилатгидроксилазы штамма рода *Pseudomonas*

К.М. Скулкина¹ (sovsemneskulkina@gmail.com), И.Ю. Позднякова-Филатова², М.В. Захарова²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, биотехнологический факультет,

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН, лаборатория Молекулярной микробиологии

Введение. Эффективность биопрепаратов для ремедиации почв на основе штаммов-деструкторов может значительно снижаться при перенесении эксперимента из лаборатории в поле. Культивирование микроорганизмов в условиях лаборатории происходит на минеральных средах, соотношение С:N в которых минимально. Чтобы исключить потенциальную возможность активации экспрессии генов деструкции полиароматических соединений бактерией *Pseudomonas putida* BS3701 за счет дефицита или профицита компонентов среды, необходимо подобрать оптимальный базовый состав среды культивирования.

Материалы и методы. Культура выращивалась на среде Evans [1] в четырех модификациях в зависимости от количества азота (Е/5, Е, 2Е и 4Е соответствовали конечным концентрациям NH_4Cl 1 мМ, 5мМ, 10 мМ и 20 мМ). Тотальную РНК выделяли реагентом TRI Reagent® по стандартной методике производителя. Измерение уровня мРНК проводилось методом RT-qPCR.

Результаты. При 2х- и 4-кратном повышении азота клетки бактерии переходят в состояние профицита, о чем свидетельствуют снижение уровня мРНК генов *rpoN* и *glnA*, служащих своеобразными «маячками» потребления азота. Уровень мРНК гена *nahU* (салицилатгидроксилаза), по литературным данным зависит от содержания салицилата в среде. Уровень мРНК гена *nahU* в поставленном эксперименте остается зависимым от наличия салицилата, однако при переходе к культивированию на средах 2Е и 4Е он снижается.

Выводы. Стандартная среда Evans является дефицитной по азоту по сравнению с 2E модификацией. Уровень мРНК гена салицилатгидроксилазы в условиях дефицита азота выше в сравнении с условиями профицита.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-05071.

Список литературы.

1. C. Evans, D. Herbert, D. Tempest, in *Methods in microbiology* (Elsevier, 1970), vol. 2, pp. 277–327.

В22. Получение рекомбинантных гликопротеинов, ассоциированных с беременностью парнокопытных, и сравнение некоторых их свойств с эндогенными белками

Д.И. Калачева (d.i.kalacheva74@gmail.com), Д.Д. Смолярова (dasha@smolyarova.ru), Е.М. Селезнева (selezneva.elizaveta192@gmail.com)

Кафедра биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Введение. Гликопротеины, ассоциированные с беременностью (PAGs) - группа из 22 гомологичных белков из семейства аспартиновых протеаз, которые вырабатываются бинуклеарными клетками трофобласта плаценты и выполняют роль сигнальных молекул между организмом матери и плодом. У парнокопытных не экспрессируется хорионический гонадотропин, являющийся надежным маркером состояния беременности. Было предложено использовать белки PAGs, которые детектируются в крови уже на 12-13 неделе после оплодотворения. Для определения концентрации эндогенных PAGs необходимо наличие рекомбинантных аналогов в качестве калибраторов. Целью данной работы было получить некоторые рекомбинантные PAGs, а также сравнить их иммунохимические свойства с эндогенными белками.

Материалы и методы. Создали генетические конструкции для экспрессии PAG1 и топPAG на основе вектора pсDNA3.4, препаратами плазмидной ДНК, выделенными из *E.coli* штамма JM109, трансфицировали клетки линии НЕК-293f. Белки очистили из культуральной среды с помощью аффинной хроматографии на пепстатин-А-агарозе и на аффинном носителе на основе моноклональных антител (СРМ101-сефароза). Уровень экспрессии белка, чистоту выделенных препаратов оценивали методами электрофореза по Лэммли, Вестерн-блоттинга и иммуноферментным анализом. Эндогенные PAGs выделяли из гомогенатов плаценты коров на тех же носителях.

Результаты. Интенсивность экспрессии рекомбинантных белков PAG1 и топPAG существенно различалась. Уровень экспрессии PAG1 составил 2 мг/л культуральной среды, тогда как экспрессия топPAG оказалась значительно ниже (0,02 мг/л). Рекомбинантные PAGs, в отличие от эндогенных, не связывались с аффинным носителем на основе Пепстатина-А. Показали, что препараты эндогенных PAGs, выделенных на пепстатин А-агарозе и СРМ101-сефарозе, существенно отличались по белковому составу, что подтверждает гетерогенность белков PAGs. При этом специфические моноклональные антитела с одинаковой эффективностью узнают как рекомбинантные, так и эндогенные PAGs, что позволяет использовать рекомбинантные белки в качестве калибраторов.

Выводы. Проведена экспрессия и получены очищенные препараты рекомбинантных PAG1 и monPAG. Рекомбинантные белки могут быть использованы в качестве калибраторов для определения концентрации эндогенных белков PAGs.

Б23. Секретируемые флуоресцентные белки для изучения динамичной локализации фитаспазы

А.Д. Теплова^{1,2} (*anastasia_teplova@mail.ru*)

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики

²НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, лаборатория молекулярной биологии гена

Введение. Фитаспаза — это субтилизин-подобная протеаза растений, участвующая в осуществлении стресс-индуцированной гибели клеток. N-концевой сигнальный пептид опосредует секрецию фитаспазы и накопление ее в межклеточной жидкости (апопласте). Однако при индукции программированной клеточной смерти фермент возвращается внутрь клетки. Чтобы понять, является ли ретроградный транспорт фитаспазы специфичным, мы сконструировали секретируемые флуоресцентные белки и сравнили их поведение с динамичной локализацией фитаспазы.

Материалы и методы. Были получены плазмидные конструкции, кодирующие лидерный пептид фитаспазы табака (SP), соединенный с флуоресцентным белком EGFP или mRFP. Рекомбинантные белки SP-EGFP и SP-mRFP были продуцированы в листьях *Nicotiana benthamiana* и *Nicotiana tabacum* с помощью агроинфекции. О локализации полученных белков судили с помощью флуоресцентной микроскопии и путем фракционирования белков клетки на апопластные и внутриклеточные с последующей детекцией белков методом иммуноблоттинга.

Результаты. Оказалось, что при продукции в листьях *Nicotiana benthamiana* белок SP-EGFP только частично процессировался и секретирувался в апопласт, а в листьях *Nicotiana tabacum* SP-EGFP не процессировался вовсе и задерживался внутри клетки. В тоже время, белок SP-mRFP полностью процессировался в клетках обоих растений, и флуоресцентный белок mRFP обнаруживался исключительно в апопласте. Поэтому впоследствии в качестве маркера апопласта был использован белок SP-mRFP.

При совместной продукции в листьях *Nicotiana tabacum* фитаспазы табака и SP-mRFP и индукции окислительного стресса антимицином А мы наблюдали ожидаемую перелокализацию фитаспазы внутрь клетки. При этом секретируемый белок mRFP сохранял апопластную локализацию.

Выводы.

1. Рекомбинантный белок SP-mRFP (но не SP-EGFP) является адекватным маркером апопласта.
2. Полученный результат указывает на то, что ретроградный транспорт фитаспазы специфичен и, вероятно, происходит при участии рецептора.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 16-14-10043).

Б24. Стерические взаимодействия антибиотиков цефалоспоринового ряда с металло-β-лактамазой

А.В. Томилко (tominastya@gmail.com), М.Г. Хренова

Кафедра квантовой химии факультета естественных наук Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева

Введение. В данной работе рассматриваются особенности взаимодействия антибиотиков цефалоспоринового ряда с активным центром металло-β-лактамазы в ходе реакции гидролиза. Интерес к тематике вызван проблемой бактериальной резистентности, в частности, за счет гидролиза антибиотиков β-лактамазами. Ввиду крайней актуальности проблемы, накоплен большой экспериментальный материал по стационарной кинетике реакции гидролиза цефалоспориновых соединений этими ферментами. Однако интерпретация различий каталитических свойств родственных соединений остается насущной задачей. Ранее предложен механизм реакции гидролиза окрашенного цефалоспоринового субстрата нитроцефина L1 металло-β-лактамазой из *Stenotrophomonas maltophilia*, рассчитанный комбинированным методом квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ). В данной работе использованы данные по структуре переходного состояния лимитирующей стадии этой реакции и рассчитаны равновесные геометрические конфигурации аналогичных состояний для 9 других соединений цефалоспоринового ряда.

Материалы и методы. Расчёты модельной системы, состоящей из белка, сольватной оболочки и соединения цефалоспоринового ряда, выполнены методом КМ/ММ в приближении PBE0-D3/6-31G**/AMBER. Для полученных равновесных геометрических конфигураций переходных состояний лимитирующей стадии реакции проанализированы распределения электронной плотности, а затем в рамках представлений теории функционала плотности рассчитаны электронные стерические характеристики активных центров. В рамках квантово-топологической теории атомов в молекулах проводился анализ стерических потенциалов в точках минимумов на линиях связей O-H, N...N и в плоскости O-H...N; стерического потенциала и плотности стерической энергии в критической точке КТ(3,+1); стерической энергии ключевых атомов.

Результаты и выводы. Рассчитаны количественные характеристики стерических взаимодействий в активном центре металло-β-лактамазы. Установлено, что по мере роста каталитической константы барьер стерического потенциала взаимодействия N...N понижается. Обнаружена линейная корреляция между стерической энергией атома кислорода, вовлеченного в водородную связь O-H...N в структуре переходного состояния лимитирующей связи, и k_{cat} .

Б25. Tat белок вируса иммунодефицита человека (HIV-1): детекция трансактивационной активности и влияние на внутриклеточные процессы

Э.П. Тонгиева (etongieva@gmail.com)

Кафедра биоинженерии биологического факультета МГУ

Введение. При применении высокоэффективной антиретровирусной терапии (HAART) лимфомы являются одной из основных причин смертности среди ВИЧ-инфицированных пациентов [1]. У них повышается вероятность развития только некоторых типов лимфом - лимфомы Беркитта [2]. Лимфома Беркитта широко распространена среди африканских детей, у которых развитие этой лимфомы связано с инфекцией вируса Эпштейн-Барр. В европейских странах и США лимфома Беркитта встречается только у пациентов, инфицированных ВИЧ.

ВИЧ продуцирует небольшой (14 kDa) белок Tat (trans-activator of transcription), который активирует транскрипцию вирусных генов и модулирует различные клеточные процессы. Tat способен выделяться из инфицированных клеток, и детектироваться в значительных концентрациях в плазме крови ВИЧ-инфицированных пациентов, проходящих антиретровирусную терапию [3]. Tat может проникать в окружающие неинфицированные клетки, в том числе, в В-лимфоциты. Хотя ВИЧ и не инфицирует В-клетки, в них проникает Tat белок что, как показано на трансгенных мышах, ведет к развитию В-клеточных лимфом [2].

Материалы и методы. Проточная цитофлуориметрия, клонирование, трансфекция, флуоресцентная микроскопия

Результаты. Была разработана система для детекции трансактиваторной активности Tat-белка. Для выявления функциональной активности EGFP-Tat использовали плазмиду, кодирующую быстросозревающий флуоресцентный белок TurboRFP под вирусным промотором (LTR). После трансфекции LTR-TurboRFP в клетках HeLa наблюдалась слабая экспрессия TurboRFP, что связано со способностью клеточных транскрипционных факторов активировать вирусный промотор. Коэкспрессия EGFP-Tat заметно увеличивала уровень экспрессии TurboRFP в культивируемых клетках, что не наблюдалось при коэкспрессии с плазмидой, кодирующей трансактивационный мутант Tat белка (EGFP-TatC22A).

Выводы. Стабильная клеточная линия, коэкспрессирующая EGFP-Tat и LTR-TurboRFP, может быть использована в качестве простой модели для скрининга веществ, ингибирующих вирусную транскрипцию.

Список литературы.

1. X. Han et al., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **26**, 303–311 (2017).
2. Y. R. Musinova, E. V. Sheval, C. Dib, D. Germini, Y. S. Vassetzky, *Cellular and Molecular Life Sciences.* **73**, 589–601 (2016).
3. S. Mediouni et al., *Infectious Disorders - Drug Targets.* **12**, 81–86 (2012).

Б26. Исследование регуляции глутаматдегидрогеназы животных путем ацилирования

А.А. Чашикова (*chashk@list.ru*), А.В. Артюхов, В.А. Алешин, К. Тило, В.И. Буник
Отдел биокинетики НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова

Введение. Глутаматдегидрогеназа (ГДГ) катализирует обратимую реакцию превращения L-глутаминовой кислоты в 2-оксоглутаровую в точке пересечения путей метаболизма аминокислот и глюкозы [1, 2]. Важную роль в регуляции ГДГ играют аллостерические активаторы (АДФ, лейцин) и ингибитор (ГТФ). В связи с ролью ацилирования в регуляции метаболических белков [3] целью данной работы является характеристика влияния ацетилирования, сукцинилирования и глутарилирования на активность и регуляцию ГДГ.

Материалы и методы. ГДГ печени быка ("Sigma") и изолированных из мозга крыс митохондрий инкубировали с уксусным, янтарным и глутаровым ангидридами (0.2-2 мМ, рН 8,1). Активность определяли в реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата (2,5 мМ) по поглощению субстрата НАДН при 340 нм [4]. Масс-спектрометрию проводили как опубликовано [4].

Результаты. Ацетангидрид значительно (80-90%) инактивировал ГДГ печени, не оказывая достоверного влияния на эффекты активаторов. Сукциновый и глутаровый ангидриды снижали максимальную скорость реакции, катализируемой ГДГ печени, в 2 раза, увеличивая относительную амплитуду активации АДФ и лейцином. Напротив, сукцинилирование и глутарилирование ГДГ мозга не влияло на фермент, тогда как ацетилирование увеличивало относительную активацию лейцином. Базальная активность ГДГ мозга при ацетилировании снижалась менее, чем в печени (40%). Масс-спектрометрия показала, что сукцинилирование и глутарилирование ГДГ более эффективно протекают в печени, а ацетилирование - в мозге. На основании данных масс-спектрометрии и кристаллических структур ГДГ (3АОЕ, 1НWУ, 3JDO, 6DНК) определено ацилирование в исследованных препаратах ГДГ остатков лизина в сайтах связывания 2-оксоглутарата (171, 183), лейцина (211), АДФ (545, 548), НАД(Ф)Н (191, 352) и ГТФ (346, 503).

Выводы. Показана тканеспецифичная регуляция ГДГ ацилированием. Глутарилирование и сукцинилирование эффективнее регулируют ГДГ печени, тогда как на ГДГ мозга большее влияние оказывает ацетилирование.

Выполнено при поддержке гранта РФФИ № 18-14-00116.

Список литературы.

1. V. Bunik, A. Artiukhov, V. Aleshin, G. Mkrtchyan, *Biology (Basel)*. 5 (2016), doi:10.3390/biology5040053.
2. C. Spanaki, A. Plaitakis, *Neurotox Res.* 21, 117–127 (2012).
3. M. D. Hirschev, Y. Zhao, *Mol. Cell Proteomics*. 14, 2308–2315 (2015).
4. G. Mkrtchyan *et al.*, *Sci Rep.* 5, 12583 (2015).

Б27. Пептидогликангидролазы колифагов RB43, RB49 и T5: их субстратная и бактериоспецифичность

В.С. Шадрин^{1,2}(valerian94@yandex.ru), С.В. Чернышов¹, Л.В. Дорофеева³, Г.В. Микулинская¹

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

²МГУ им. Ломоносова

³ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

Введение. Пептидогликангидролазы (или эндолизины) бактериофагов представляют собой ферменты, разрушающие пептидогликановый слой клеточных стенок бактерий. Благодаря иному, чем у антибиотиков, механизму действия, появляется возможность использовать их в качестве альтернативы при лечении заболеваний, вызванных антибиотикорезистентными возбудителями.

В нашем исследовании объектами изучения являлись эндолизины колифагов RB43, RB49 и T5. Было известно, что данные ферменты представляют собой L-аланоил-D-глутаматпептидазы семейства M15 и осуществляют гидролиз пептидогликана типа A1γ (по классификации Шлейфера) у грамотрицательных бактерий. Но гидролизуемая связь L-Ala-D-Glu также встречается и в других вариантах пептидогликана типа A. Поэтому целью исследования стало изучение взаимосвязи бактериоспецифичности эндолизинов колифагов RB43, RB49 и T5 с химическим строением пептидогликана, а также взаимосвязи скорости гидролиза со стадией роста бактериальной культуры.

Материалы и методы. В работе использовались коллекционные штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий; анионообменная и катионообменная хроматографии; спектрофотометрическое определение скорости лизиса клеток при 450 нм на суспензионных культурах.

Результаты. Изучаемые ферменты были выделены из клеток штаммов-продуцентов и очищены до состояния электрофоретической гомогенности с помощью хроматографических методов. Было проведено исследование на 14 видах бактерий с разным строением пептидогликана. Кроме пермеабилizованных ЭДТА или хлороформом клеток грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* PAOI и *Escherichia coli* B, лизису хотя бы одним из ферментов были подвержены 4 вида грамположительных бактерий: *Bacillus megaterium*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* (пептидогликаны типа A1γ, причем два последних амидированы в разных положениях) и *Cellulomonas flavigena* (пептидогликан типа A4β). Отношение скоростей лизиса на клетках в экспоненциальной и стационарной фазах колебалось от 1,27 (эндолизин RB43 на *B. subtilis*) до наличия активности только в экспоненциальной фазе (эндолизин T5 на клетках *B. licheniformis*).

Выводы. Бактериоспецифичность изучаемых эндолизинов шире, чем у соответствующих фагов. Отсутствует прямая зависимость между специфичностью данных ферментов и химическим строением пептидогликана. Литическая активность зависит от фазы роста культуры: наибольшая скорость гидролиза наблюдалась на клетках в экспоненциальной фазе.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00492.

Б28. Изучение эффекта различных координационных комплексов Cu с азот-содержащими лигандами на пептидазную активность протеасомы

В.С. Шашковская (verashashkovskaya@gmail.com), А.В. Бачева

МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химии природных соединений

Введение. Ингибирование протеасомы приводит к остановке клеточного цикла и к апоптозу клеток с активным синтезом белка. Также известно, что при некоторых нейродегенеративных заболеваниях функция протеасомы подавлена и ее активация может быть одним из способов терапии таких заболеваний. В связи с этим, ингибиторы и активаторы протеасомы можно рассматривать как терапевтические агенты для различных заболеваний. В последнее время интенсивно изучаются соединения на основе меди и органических лигандов, способные селективно вызывать апоптоз опухолевых клеток. Такие комплексы потенциально являются ингибиторами протеасомной активности. Исследования доказали, что повышенная протеасомная активность и способность катионов меди преимущественно накапливаться в опухолевых клетках по сравнению со здоровыми – уникальные особенности трансформированных клеток, которые могут быть использованы как мишени в противоопухолевой терапии.

Материалы и методы. Выделение 20S и 26S протеасомы из гомогената печени мыши проводили с использованием хроматографических методов: гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Отсутствие других протеаз в очищенном препарате подтверждали ингибиторным анализом. Для кинетических измерений использовали пептидные субстраты, при гидролизе образующие флуоресцентный продукт – 7-амино-4-метилкумарин. В данной работе использовали ингибиторы и активаторы, в состав которых входят ионы Cu(II, I) и Co(II) с органическими лигандами, содержащими азот и серу.

Результаты. Были определены значения концентраций полуингибирования каспазо-, трипсин- и химотрипсин-подобной активностей 20S и 26S протеасомы исследуемых комплексов на трех пептидных субстратах (Z-Leu-Leu-Glu-AMC, Ac-Arg-Leu-Arg-AMC, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC), установлен тип ингибирования. Среди изученных соединений были обнаружены комплексы, селективно активирующие пептидазную активность протеасомы только по одному из субстратов. Низкомолекулярных соединений, активирующих протеасому, известно крайне мало.

Выводы. Наилучшие результаты достигнуты при ингибировании трипсин-подобной активности 20S и 26S протеасомы ингибитором Cu₂[OK-609]Cl₃.

Б29. Влияние pH среды на времена жизни флуоресценции сенсорного белка *SypHer3s*

*М.И. Янтурина*¹ (*maryant@mail.ru*), *П.А. Бабаев*¹, *Е.Г Максимов*², *А.А. Пахомов*³

¹*Московский физико-технический институт (государственный университет)*

²*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова*

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

Введение. Изучение спектрально-кинетических характеристик зеленого флуоресцентного белка (GFP) и его гомологов представляет интерес для разработки новых биосенсоров. Так, с помощью сайт-направленного мутагенеза аминокислотных остатков на основе GFP были последовательно получены белки *HyPer* - флуоресцентный сенсор внутриклеточного пероксида водорода и *SypHer3s* - перспективный ратиометрический сенсор pH. *SypHer3s* имеет два максимума поглощения при 410 нм и 495 нм и максимум излучения флуоресценции при 525 нм. При увеличении pH интенсивность поглощения *SypHer3s* при 410 нм снижается, а на 495 нм возрастает, что делает возможным определение внутриклеточного pH по соотношению интенсивности флуоресценции при возбуждении на 410 и 495 нм. Для картирования клеток по величине pH требуется последовательное получение изображений с различным возбуждением флуоресценции, что с одной стороны затрудняет исследование динамики внутриклеточных процессов, с другой стороны, уровень флуоресцентного сигнала сильно зависит от концентрации белка в клетке, что может приводить к невоспроизводимым соотношениям флуоресценции при разных уровнях экспрессии генов флуоресцентных белков. Артефакты в определении pH возможны также и из-за автофлуоресценции клеток, особенно при возбуждении в районе 400 нм.

Материалы и методы. Мы предположили, что pH может оказывать влияние на времена жизни флуоресценции *SypHer3s*. Для проверки этой гипотезы в работе использовали препараты *SypHer3s* в семи буферных растворах с pH 6.5-9.5 (шаг 0.5). Для определения времен жизни регистрировали мгновенные спектры флуоресценции при возбуждении образцов пикосекундными лазерами 405, 450 и 510 нм.

Результаты. Было установлено, что при увеличении pH происходит двукратный рост длительности флуоресценции при возбуждении на 450 нм.

Выводы. Этот результат показывает, что *SypHer3s* может быть использован для детектирования внутриклеточного pH методом микроскопии времени жизни флуоресценции (fluorescence-lifetime imaging microscopy, FLIM).

Секция «Молекулярная и клеточная биология»

М1. Разработка метода полногеномного анализа инсерций ретротранспозонов L1 с помощью мишень-направленного массивного параллельного секвенирования

М.С. Протасова¹ (maria2100@list.ru), Е.А. Алемасцева^{1,2}, Ф.Е. Гусев¹, А.П. Григоренко^{1,4}, Т.В. Андреева^{1,3}, И.Л. Кузнецова¹, Е.И. Погаев^{1,2,3,4}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

²МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра генетики

³МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, центр генетики и генетических технологий

⁴Университет Медицинской школы Массачусетса

Введение. L1 ретротранспозоны (L1) представляют собой мобильные генетические элементы, способные к распространению в геноме. L1 содержат регуляторные последовательности и, поэтому, могут влиять на экспрессию генов. Активность L1 отмечена в соматических клетках мозга, а при некоторых заболеваниях наблюдаются изменения активности L1, что делает L1 предметом для исследований в области патологий мозга.

Материалы и методы. Для оценки генетической вариабельности локализации L1 был разработан оригинальный метод геномного мишень-направленного (таргетного) секвенирования участков L1 инсерций. Для таргетного обогащения были разработаны специальные адапторы и олигонуклеотидные последовательности, позволяющие избирательно амплифицировать и затем секвенировать участки генома, содержащие сайты L1 инсерций. Секвенирование было проведено на приборе Illumina HiSeq 2000/2500. Для тестирования метода и поиска соматических мутаций были использованы образцы ДНК мозга человека. Для анализа данных массивного параллельного секвенирования, в том числе для идентификации редких соматических мутаций, были написаны уникальные скрипты, включающие программы BWA, BedTools, Samtools, RepeatMasker и HMMER. Валидация инсерций проводилась с помощью ПЦП прямого секвенирования по Сенгеру.

Результаты. Разработан метод, с помощью которого возможен эффективный поиск новых инсерций L1 в индивидуальных геномах. С помощью данного метода выявлены врожденные и соматические L1 инсерции в образцах ДНК мозга пожилых индивидов с болезнью Альцгеймера и группы нормы. Врожденные инсерции представляют собой полиморфные L1 локусы и вносят вклад в популяционное разнообразие генома. Соматические инсерции составили большую часть выявленных новых инсерций. Большая часть соматических инсерций находится в некодирующих областях вне генов и в интронах генов. Анализ с помощью программы Gene Ontology показал, что, по крайней мере, некоторые гены, в которых обнаружены соматические инсерции, могут быть вовлечены в нейрональные процессы.

Выводы. Разработанный метод таргетного секвенирования применим для выявления инсерций L1 как врождённых, так и соматических в клетках тканей человека. Первичный анализ показал возможность анализа соматического мозаицизма L1 в клетках мозга, в том числе и в генах, участвующих в функциях нервной системы.

Разработка метода анализа L1 инсерций выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00440. Количественный анализ L1-ретротранспозонов выполнен при поддержке РНФ (Соглашение № 14-44-00077).

М2. Изучение роли факторов, действующих через вторичный канал РНК-полимеразы, в сопряжении транскрипции и репарации ДНК

Е.Г. Афанасьева^{1,2} (Lenkaffa@yandex.ru)

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедра молекулярной биологии

²Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН

Введение. Транскрипционный фактор DksA, действуя синергетично с гуанозин-5'-дифосфат-3'-дифосфатом (ppGpp), изменяет свойства инициаторного комплекса РНК-полимеразы при ответе бактериальной клетки на стресс. Показано участие DksA и ppGpp в элонгации транскрипции и сопряжении транскрипции с репарацией ДНК. Связываясь с РНК-полимеразой в районе вторичного канала, DksA аллостерически регулирует ее активность.

Фактор TraR, кодируемый конъюгативной плазмидой F, имеет структурное сходство с DksA. Он оказывает подобный DksA эффект на инициацию транскрипции, но его действие не зависит от ppGpp. Ничего об участии TraR в процессе сопряжения транскрипции с репарацией ДНК ранее известно не было.

Материалы и методы. Были внесены прецизионные изменения в ген *dksA* *Escherichia coli*. Полученные штаммы были протестированы на чувствительность к разным типам повреждений ДНК.

Ген *traR*, клонированный в экспрессионный вектор, был протестирован в штаммах *E. coli* дикого типа, а также штаммах с нарушенным синтезом ppGpp и инактивированным геном *dksA*.

Результаты. Делеция С-концевой α -спирали DksA, нарушающая его связывание с РНК-полимеразой, приводит к повышенной чувствительности клеток *E. coli* к мутагенам, как и делеция целого гена *dksA*. Замена N88I в DksA, увеличивающая сродство фактора к РНК-полимеразе, частично суппрессирует эту чувствительность и полностью восстанавливает рост клеток, дефектных по синтезу ppGpp, на различных мутагенах. Из двух замен консервативных аминокислот D71 и D74, замена D74N делает клетки более чувствительными к генотоксичному стрессу.

Введение полового фактора F⁺ в мутантные штаммы ppGpp⁰ и $\Delta dksA$ приводит к частичной супрессии их чувствительности к метилметансульфонату. Экспрессия гена фактора TraR, кодируемого плазмидой, повышает устойчивость клеток к разным типам генотоксичных агентов.

Выводы.

1. Характер связывания фактора DksA с РНК-полимеразой определяет его активность и зависимость от ppGpp в координации транскрипции и репарации ДНК. Аллостерическая регуляция РНК-полимеразы фактором DksA и ppGpp играет важную роль в репарации ДНК.
2. Фактор TraR способен осуществлять функции ppGpp и DksA *in vivo* в условиях генотоксичного стресса.

М3. Т-кадгерин как ранее неизвестный рецептор липопротеидов низкой плотности на тромбоцитах

*А.И. Баглай (baglay.alexandra@yandex.ru), М.Н. Балацкая
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова*

Введение. Высокий уровень липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) в крови увеличивает риск развития атеротромбоза. Показано, что ЛПНП запускают кальциевую сигнализацию в тромбоцитах, которая приводит к активации, агрегации и адгезии тромбоцитов. Однако до сих пор не известен рецептор, опосредующий данные эффекты на тромбоцитах, а также молекулярный механизм данного процесса. На эндотелиальных и гладкомышечных клетках сигнальные эффекты ЛПНП опосредует нетипичный гликозилфосфатидилинозитол(ГФИ)-заякоренный белок суперсемейства кадгеринов – Т-кадгерин. Мы предположили наличие в тромбоцитах Т-кадгерина как рецептора ЛПНП.

Материалы и методы. В настоящей работе использовались тромбоциты, полученные из крови здоровых доноров, и клетки линии мегакариоцитов MEG-01. Изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и адгезионной способности тромбоцитов в ответ на добавление ЛПНП было проанализировано соответственно с помощью микроскопии с использованием кальциевого зонда Indo-1 и метода, позволяющего измерять импеданс на поверхности. Для идентификации Т-кадгерина использовали методы проточной цитометрии, конфокальной микроскопии и иммуноблоттинга с применением различных антител против Т-кадгерина.

Результаты. Добавление ЛПНП к тромбоцитам вызвало увеличение внутриклеточного Ca^{2+} , а также увеличение адгезии на подложку. С использованием конфокальной микроскопии и проточной цитометрии было показано, что Т-кадгерин локализуется на мембранах тромбоцитов и мегакариоцитов. Инкубация тромбоцитов с фосфатидилинозитол-специфичной фосфолипазой С вызвала снижение сигнала от используемых антител против Т-кадгерина, что подтверждает их специфичность. Метод иммуноблоттинга позволил получить информацию о Т-кадгерине с кажущейся молекулярной массой в 160 и 180 кДа (молекулярная масса в эндотелиальных и гладкомышечных клетках 105 и 130 кДа). Эти данные позволяют высказать предположение о ранее неизвестной изоформе Т-кадгерина.

Выводы. Настоящие результаты показывают наличие на тромбоцитах и мегакариоцитах Т-кадгерина, который может опосредовать функциональные ответы на ЛПНП этих клеток.

Исследование выполнено за счёт гранта РФФИ № 18-015-00372.

М4. Исследование взаимодействия антител GFAP81 и GFAP83 с нативным и рекомбинантным глиальным фибриллярным кислым белком

В.С. Ботнаревский¹, М.А. Марченко¹, Е.П. Альтшулер¹, И.А. Катруха¹, О.С. Лебедева²

¹*Кафедра Биохимии, Московский Государственный университет им. М.В. Ломоносова*

²*ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Введение. Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) – специфичный для нервной системы белок промежуточных филаментов, экспрессируемый зрелыми клетками глии. Иммунохимическое определение GFAP в крови или спинномозговой жидкости применяется для диагностики повреждений клеток ЦНС, в том числе при травме мозга и ишемическом инсульте. Целями нашей работы было получение рекомбинантного стандарта GFAP человека, сравнение некоторых его биохимических и иммунохимических свойств со свойствами нативного белка и исследование взаимодействия моноклональных антител GFAP81, GFAP83 с рекомбинантным GFAP и белком клеток глии, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека.

Материалы и методы. Для получения рекомбинантного белка использовали молекулярно-генетическую конструкцию на основе вектора рЕТ22b+, экспрессию белка проводили в штамме *E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS. Белок из телец включения растворяли в 8М мочеvine и переводили в буфер с низкой ионной силой (16 mM NaHCO₃) методом гель-фильтрации (Sephadex G-25). Исследование полимеризации GFAP проводили методами гель-фильтрации (Sephacryl S-300 HR 16/60) и нативного электрофореза. Сравнение иммунохимических свойств нативного и рекомбинантного GFAP осуществляли методами вестерн-блоттинга и сэндвич-ИФА. Дифференцировку ИПСК в клетки глии проводили, используя белковые факторы FGF2, EGF, CNTF. Взаимодействие исследуемых антител с GFAP глиальных клеток тестировали при помощи методов проточной цитофлуориметрии и иммуноцитохимии.

Результаты. Получен препарат рекомбинантного GFAP, обладающий сходной с нативным белком иммунохимической активностью. Как рекомбинантный, так и нативный GFAP в растворе образуют надмолекулярные структуры, которые предположительно являются фибриллами и/или агрегатами белка. Антитела GFAP81 и GFAP83 специфично взаимодействуют с рекомбинантным GFAP и белком глиальных клеток, полученных из ИПСК человека, и могут быть использованы для детекции GFAP человека в различных приложениях.

Работа частично поддержана грантом РФФИ 17-04-01261.

М5. Динамика изменения активности, а также экспрессии каталитических субъединиц протеасом в условиях адаптации эукариотической клетки к тепловому шоку.

А.В. Буров^{1,2} (alexanderburov1998@gmail.com), Д.С. Снасская², А.В. Морозов², В.Л. Карпов²

¹Кафедра Молекулярной биологии Биологического факультета, МГУ им. М.В. Ломоносова

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН;

Введение. Убиквитин-протеасомная система (УПС), осуществляет протеолиз большинства внутриклеточных белков. Ключевыми элементами УПС являются мульти-субъединичные белковые комплексы - протеасомы. Протеасомы играют важную роль при адаптации клеток к различным стрессам, однако, изменения, происходящие с УПС после теплового шока (ТШ) изучены недостаточно. Цель данной работы - исследование динамики функциональной активности и экспрессии субъединиц протеасом в клетках после ТШ.

Материалы и методы. В работе были использованы клетки моноцитарной лимфомы человека линии U937. Тепловой шок вызывали инкубацией клеток в течение часа при 43°C, после чего клетки инкубировали при 37°C. Образцы отбирали сразу, через 2, 4, 6, 8, 24 и 48 часов после ТШ, выделяли РНК, параллельно получали лизаты клеток. Уровень мРНК протеасомных генов определяли методом ПЦР в реальном времени. В лизатах клеток определяли химотрипсинподобную активность и содержание субъединиц протеасом по гидролизу флуорогенного субстрата и методом иммуноблоттинга, соответственно.

Результаты. Выявлено изначальное снижение (до 65%) активности протеасом в лизатах клеток, затем через 10 часов после ТШ следовало постепенное восстановление активности. Количество α -субъединиц протеасом в клетках снижалось уже через 2 часа после ТШ, к 24-48 часам их концентрация также постепенно восстанавливалась. Разработана новая система для количественной оценки уровня экспрессии протеасомных генов. С ее использованием показано волнообразное изменение содержания специфических мРНК в клетках с максимумом через 2 часа и постепенным снижением к 48 часам после ТШ. Оценено среднее количество копий мРНК протеасомных генов в пересчете на одну клетку, составлявшее от 10 для низко- до 150 для высокоэкспрессируемых генов.

Выводы. Получены новые данные, характеризующие процессы адаптации клеток к тепловому шоку. Результаты отражают важную роль УПС в поддержании гомеостаза.

М6. Получение первичной культуры кардиомиоцитов крысы и идентификация в ней сердечной изоформы тропонина Т

Т.В. Васильева¹, А.С. Мулюкина¹, Д.А. Федоров¹, М.М. Артемьева², Н.А. Медведева², Н.Б. Свиридкина², Д.В. Серебряная¹, И.А. Катруха¹

¹Кафедра биохимии, Биологический факультет МГУ

²Кафедра физиологии человека и животных, Биологический факультет МГУ

Введение. Первичная культура кардиомиоцитов неонатальных крыс широко используется в качестве модельной системы для исследований функционирования сердечной ткани в норме и при патологии. Одним из способов детекции кардиомиоцитов в культуре является иммунохимическое окрашивание клеток антителами, специфичными к сердечной изоформе тропонина Т (сТнТ). Целью работы было получение первичной культуры кардиомиоцитов и создание системы для иммунохимической детекции тропонина, состоящей из рекомбинатного и нативного стандартов сТнТ и моноклональных антител (мАт), специфически взаимодействующих с тропонином крысы.

Материалы и методы. На основе вектора рЕТ28а+ получали молекулярно-генетические конструкции, содержащие кДНК сТнТ человека (предсинтезированный ген) и крысы (кДНК выделена из сердечной ткани). Экспрессию белков проводили в штамме *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. Очистку рекомбинатных сТнТ и нативного сТнТ (из сердечной ткани крысы) проводили методом аффинной хроматографии на носителе с иммобилизованными анти-сТнТ мАт. Взаимодействие мАт ТнТ329, ТнТ406, ТнТ7Е7 с сТнТ крысы тестировали методами иммуноблоттинга, иммуноферментного и иммуноцитохимического анализа. Первичную культуру кардиомиоцитов получали путем ферментации сердечной ткани 2-3 дневных крысят с 0,2% коллагеназой или 0,25% трипсином.

Результаты. Были получены рекомбинантные сТнТ человека и крысы и нативный тропониновый комплекс сердца крысы. Антитела ТнТ406 и ТнТ7Е7 взаимодействуют с сТнТ крысы во всех иммунохимических приложениях. Антитело ТнТ329 не связывает сТнТ в клетках при иммуноцитохимическом анализе. Первичная культура, полученная с использованием коллагеназы, насыщена кардиомиоцитами, собранными в сокращающиеся кластеры. При использовании трипсина культура содержит меньшее число кардиомиоцитов, преимущественно представленных в виде одиночных клеток.

Выводы.

1. Получены препараты белков-стандартов сТнТ крысы и человека;
2. Антитела ТнТ406 и ТнТ7Е7 специфически взаимодействуют с сТнТ крысы во всех исследованных иммунохимических приложениях;
3. Коллагеназный метод выделения первичной культуры кардиомиоцитов из сердца крысы более эффективен, чем метод с использованием трипсина.

М7. Необычная организация 18S рРНК у представителя полухордовых

С.А. Веселова (vesoka27@gmail.com), Е.Д. Рюмина (ryu-ekaterina@yandex.ru)

Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова

Введение. Для одного из представителей полухордовых (вид неизвестен) была получена последовательность гена 18S РНК. Выравнивание ее с аналогичными последовательностями других полухордовых выявило две уникальные вставки, природа которых неизвестна.

Материалы и методы. Выделение ДНК проводили набором “Диатом” (Изоген) согласно протоколу производителя. Последовательность определяли секвенированием по Сэнгеру, далее выравнивали с гомологичными последовательностями других организмов из базы данных GenBank. Были определены координаты и последовательности двух вставок. Для них получены выравнивания в NCBI BLAST и варианты вторичных структур с помощью программ Ssualign [1] и Mfold [2]. Также построены филогенетические деревья для 18S рРНК.

Результаты. Были получены последовательности 18S рРНК неизвестного вида полухордовых. На основании их анализа определено положение изучаемых организмов на филогенетическом дереве полухордовых. Оказалось, что изучаемый вид сильно отличается от других представителей таксона. Это чрезвычайно интересно, учитывая наличие необычных вставок в переменных областях молекулы 18S РНК. Для вставок было определено местоположение, смоделирована вторичная структура 18S рРНК и вставок отдельно.

Выводы. Полученные результаты демонстрируют полную идентичность последовательности 18S имеющихся представителей данного вида и их отличие от остальных полухордовых. Главным отличием являются вставки. Версия интронов была отвергнута: длина вставок меньше 100 п.н. Вставки находятся в районах V4, V7. Район V4 - самый переменный участок 18S рРНК. Однако такая вставка - явление исключительное: в GenBank похоже вставки из всех полухордовых есть только у *Stereobalanus canadensis*. Выравнивание самой вставки не дает разумных результатов, а полученные варианты вторичных структур сильно разнятся при схожей энергии Гиббса, поэтому требуется более детальный анализ для установления природы и структуры вставки.

Список литературы.

1. E. P. Nawrocki, D. L. Kolbe, S. R. Eddy, *Bioinformatics*. **25**, 1335–1337 (2009).
2. M. Zuker, *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406–3415 (2003).

М8. Разработка активаторов/репрессоров экспрессии генов в клетках млекопитающих на основе CRISPR-Cas9 системы редактирования генома

Н.А. Груздева (*gruzdeva@biocad.ru*)^{1,2}, А.А. Круглов^{1,2}, Ю.В. Евдокимовская², А.В. Кононов^{1,2}, В.В. Соловьев^{1,2}, Ю.И. Басовский^{1,2}

¹ФГБОУ ВПО Пуцинский государственный естественно-научный институт, факультет молекулярной и клеточной биотехнологии Россия;

²ЗАО «BIOCAD», Любучаны, Россия

Введение. Возможность управления уровнем экспрессии определенных генов в клетке дает экспериментатору широкие возможности по контролируемому воздействию на ее фенотип, ростовые, метаболические и секреторные характеристики. Однако, существующие подходы к регуляции экспрессии генов несовершенны. Они позволяют либо выключить ген (нокаут), либо понизить его активность с мало предсказуемой и нестабильной эффективностью (нокдаун). Активировать выбранный ген, что зачастую более важно, данными методами невозможно.

Цель. Создать синтетические активаторы и ингибиторы транскрипции генов в клетках млекопитающих на основе CRISPR-Cas9 системы редактирования генома.

Материалы и методы. Разработан и собран *de novo* вектор, кодирующий каталитически неактивную форму нуклеазы Cpf1, слитую с комплексом доменов активации транскрипции VPR. Сконструирован также вектор, кодирующий каталитически неактивную форму нуклеазы Cas9, слитую с доменом ингибирования транскрипции KRAB. Эти же вектора кодируют молекулу guide RNA (gRNA), комплементарную определенному участку исследуемого промотора. Эффективность созданных модификаторов транскрипции оценивалась после трансфекции ими культуры клеток HEK293/*FLuc* по изменению уровня экспрессии репортерного гена люциферазы, стабильно экспрессирующегося в этой линии.

Результаты. Созданный синтетический активатор усиливал экспрессию репортерного гена в 2,5 раза. Ингибитор транскрипции снижал уровень экспрессии репортерного гена на 80% относительно базального уровня. По итогам анализа панели различных вариантов gRNA была показана зависимость увеличения/снижения уровня люминесценции от близости расположения сайта узнавания gRNA к точке начала транскрипции. Это свидетельствует о возможности тонкой регуляции уровня транскрипции.

Выводы. Разработана универсальная платформа, позволяющая в широком диапазоне изменять уровень экспрессии целевых генов в клетках млекопитающих. Данный подход может найти применение в инженерии клеточных линий, в том числе для создания/модификации линий-продуцентов терапевтических белков и продуктов в области генной и клеточной терапии.

М9. Новые подходы к анализу пространственной организации генома

С.Ю. Сосновская^{1,2} (*sophie2811@mail.ru*), А.Н. Закиров^{1,2} (*zakirovami@gmail.com*)

¹кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. Ломоносова

²НИИ ФХБ им. Белозерского

В настоящее время все ещё открытым остаётся вопрос о принципах пространственной организации генома. Существующие точки зрения варьируют от идеи существования высших уровней организации хроматина до модели «polymer melt», постулирующей их полное отсутствие.

Разнообразие гипотез связано с тем, что хроматин является очень гетерогенным объектом, структурное состояние которого чувствительно к внешним условиям. Одним из подходов преодоления этой проблемы представляется анализ ультраструктуры и динамики определённых последовательностей генома на фоне тотально меченой ДНК. При этом необходимым условием данных исследований является сохранение нативного состояния хроматина, что может быть достигнуто, например, при помощи прижизненного репликативного мечения и фиксации образцов глутаровым альдегидом, который является предпочтительным для сохранения прижизненного состояния ультраструктур.

Нами разработан метод двойного окрашивания ДНК при помощи визуализации репликативной метки методами click-химии с использованием наночастиц золота и фотоконвертируемого ДНК-связывающего красителя, который совместим со способами стабилизации нативной структуры клетки для исследования методами просвечивающей электронной микроскопии.

Материалы и методы. Репликативное мечение хроматина с визуализацией при помощи click-химии и наночастиц золота, методы металлографии, метод ChromEMT, иммунофлуоресцентная микроскопия супер-разрешения, иммуноэлектронная микроскопия и электронная томография.

Результаты. Репликативная метка была визуализирована на электронномикроскопическом уровне в нативных условиях в объёме. В гетеро- и эухроматических участках генома, выявляемых по паттернам репликации, наблюдалась организация нулеосомных фибрилл размером порядка 100 нм. Был разработан и применён метод двойного окрашивания новосинтезированной и тотальной ДНК для анализа пространственной организации хроматина на электронномикроскопическом уровне.

Выводы.

1. Использование click-химии в сочетании с детекцией на основе biotin-streptavidin совместимо с фиксацией глутаровым альдегидом для визуализации новосинтезированной ДНК на электронномикроскопическом уровне;
2. Анализ ультраструктуры реплицирующегося эу- и гетерохроматина говорит в пользу универсальности высших уровней организации хроматина.

М10. Участие сигнала ядерной локализации бактериальных патогенов в индукции синтеза гамма-тионина

А.С. Корзина (*askorzina@gmail.com*)^{1,2}, Е.В. Шешукова² (*ekaterina.sheshukova@gmail.com*)

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова факультет биоинженерии и биоинформатики

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Проникновение бактерий в растительную клетку сопровождается запуском систем защиты клетки от бактериальных белков, в функции которых входит изменение важных клеточных процессов, таких как транскрипция, репликация, ремодулирование хроматина. Одними из таких бактериальных белков являются белки, способные использовать транспортные системы растения и направляться в ядро клетки. Такие белки носят название нуклеомодулинов [1] и содержат последовательность сигнала ядерной локализации (NLS), благодаря которой осуществляется их транспортировка в ядро. В свою очередь защитные системы клетки запускают интенсивный синтез антимикробных пептидов – дефензинов. Объектом исследования нашей работы является один из таких пептидов – гамма-тионин [2]. Мы предположили, что сам сигнал ядерной локализации бактериальных нуклеомодулинов может являться индукторами антибактериальной защиты, выражающейся в стимулировании синтеза мРНК гамма-тионина. Для проверки этого предположения, мы создали тестовую систему, включающую (а) бинарную конструкцию, кодирующую ген GUS под контролем тионинового промотора (ThPr-GUS) и (б) транзientную систему экспрессии, где наблюдали синтез мРНК GUS в присутствии NLS эффекторного белка-нуклеомодулина VirE3 из бактерии *Agrobacterium tumefaciens* (35S-GFP:NLS^{VirE3}), слитого с белком GFP в качестве носителя. С помощью количественной ПЦР в реальном времени мы показали в соответствии с нашей гипотезой, что в присутствии гена GFP:NLS^{VirE3} транзientная экспрессия гена GUS, направляемого тиониновым промотором, приводит как к повышенному накоплению мРНК, так и белка GUS. Наша гипотеза допускает, что стимулирующий эффект NLS – неспецифический, а, следовательно, любой NLS в нашей транзientной системе экспрессии может вызвать индукцию синтеза мРНК GUS. Для проверки этого предположения мы создали конструкцию, кодирующую GFP слитый с NLS ядерного белка человека, протимозина альфа, (35S-GFP:NLS^{pTα}). Проведенный анализ подтвердил наше предположение. Действительно, GFP:NLS^{pTα} также способен индуцировать синтез мРНК GUS.

Мы заключили, что сигнал ядерной локализации бактериальных нуклеомодулинов является неспецифическим индуктором гамма-тионина как фактора антибактериальной защиты.

Список литературы.

1. Н. Bierne, P. Cossart, *Cellular Microbiology*. **14**, 622–633 (2012).
2. P. B. Pelegriani, O. L. Franco, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 2239–2253 (2005).

М11. Мутации в различных доменах ламина А изменяют механические свойства ядра

С.В. Лаврушкина¹ (blodemwold@gmail.com), А.С. Юдина², Н.Л. Овсянникова^{2,3}

¹*Кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета, МГУ имени М.В. Ломоносова*

²*Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ имени М.В. Ломоносова*

³*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова*

Введение. Ядерные промежуточные филаменты – ламины А- и В-типов – формируют скелет ядра, поддерживающий его структуру и участвующий в реализации многих функций. Мутации этих белков являются причиной широкой группы заболеваний – ламинопатий. Согласно одной из гипотез это может быть связано с нарушением полимеризации мутантных белков. Однако, каким образом это происходит в живых клетках до сих пор неясно.

Цель работы. Визуализировать структуру ядерного скелета в норме и при патологиях, а также оценить механические свойства ядра.

Материалы и методы. Были использованы линии культур SMC, CPC человека, RC (rat cardiomyocyte) и их трансгенные производные (экспрессирующие нормальный ламин А и мутантные формы этого белка G465D, R471C, R482L, R527C, шитые с GFP), а также культура на основе HT1080 с постоянной экспрессией прогерин-GFP (Δ 50LA). Изображения структур, формируемых мутантными белками, были получены на культуре CPC с помощью микроскопии структурированного освещения. Устойчивость таких клеток к механическому стрессу была изучена путем их обработки гипотоническим раствором Хэнкса (15/30 %). Оценка механических свойств ядра проводили на клетках гетерогенной популяции HT1080 Δ 50LA с помощью ионного сканирующего микроскопа, позволяющего получить показатели жесткости с высоким пространственным разрешением.

Результаты. Анализ микроскопических изображений показал, что расстояния между промежуточными филаментами ядра в клетках, несущих мутации, увеличено. Кроме того, до обработки гипотоническим раствором в некоторых клетках наблюдаются локальные нарушения ядерного скелета и асимметрия ядра. Анализ жесткости ядерной оболочки не показал различий среди контрольных клеток и экспериментальных.

Выводы.

1. При мутациях происходит локальное увеличение расстояний между микродоменами ядерной ламины более чем в 5 раз;
2. Оценка биофизических параметров в культуре клеток, продуцирующих прогерин, не показала достоверных различий.

M12. Определение структуры CRISPR кассет методами высокоэффективного секвенирования

П.В. Музюкина (Polina.Muziukina@skoltech.ru), А.О. Шкарута, А.И. Рыкачевский, К.В. Северинов, Е.Е. Савицкая

Life Science, Сколковский институт науки и технологий

Введение. Защитная система прокариот, известная как CRISPR-Cas, состоит из наборов *cas* генов и CRISPR кассет, которые представляют собой совокупность уникальных последовательностей – спейсеров, разделенных идентичными повторами. Вместе с белками семейства Cas, CRISPR кассеты обеспечивают адаптивный иммунитет бактерий, способный противостоять мобильным генетическим элементам, таким как бактериофаги и плазмиды. Спейсеры, как правило, встраиваются с одного конца CRISPR кассеты. По набору и последовательности расположения спейсеров определенной бактерии можно проследить историю её взаимодействия с фагами. Метод амплификация спейсеров CRISPR кассет с помощью олигонуклеотидов, комплементарных CRISPR повторам, с последующим высокоэффективным секвенированием был предложен для определения представленности различных спейсеров в популяциях бактерий. В нашем исследовании мы разрабатываем инструмент, который позволит не только определять состав спейсеров, но и с высокой точностью восстанавливать их взаимное расположение в кассетах и количественные соотношения различных кассет в смешанных популяциях бактерий.

Материалы и методы. Объектами нашего исследования были штаммы изоляты *Escherichia coli* и *Clostridium difficile*, геномы которых содержат CRISPR системы типов I-E и I-B, соответственно. Были подобраны вырожденные праймеры, которые охватывают известное разнообразие повторов каждого из видов. Для уменьшения сдвигов в количественном соотношении спейсеров, имеющих место при амплификации, были протестированы различные условия: использование полимеразы Q5, уменьшение количества циклов, включение адаптеров Иллюмина на стадии амплификации. Для восстановления взаимного расположения спейсеров CRISPR кассет были проанализированы прочтения Иллюмины, содержащие два спейсера.

Результаты. Был разработан протокол амплификации и секвенирования спейсеров CRISPR кассеты, который позволил восстановить CRISPR кассеты в смеси двух штаммов как для *Clostridium difficile*, так и для *Escherichia coli*, а также определить примерное количественное соотношение штаммов в анализируемых смесях. В дальнейшем мы планируем применить разработанный нами протокол для восстановления CRISPR кассет в более сложных бактериальных популяциях.

Выводы. Разработанный инструмент для анализа CRISPR кассет позволит расширить нынешние знания о фаговом разнообразии, а также может быть использован для определения состава штаммов бактерий на основании их CRISPR кассет и предсказать чувствительность штаммов к бактериофагам, что может найти применение при составлении стратегии индивидуальной фаговой терапии.

M13. Роль длинной некодирующей РНК roX в поддержании структуры комплекса дозовой компенсации *Drosophila melanogaster*

С.А. Пирогов (*biologsp@gmail.com*), О.Г. Максименко
Институт биологии гена

Введение. Комплекс дозовой компенсации (MSL-комплекс) *D. melanogaster* необходим для двукратного повышения экспрессии генов на X-хромосоме самцов. Этот РНК-белковый комплекс включает в себя пять обязательно присутствующих белков (MSL1, MSL2, MSL3, MLE, MOF) и несколько дополнительных (CLAMP, JIL1, Toro2), а также одну из двух возможных длинных некодирующих РНК roX. Несмотря на изучение данного явления в течение более чем полувека, до сих пор нет чёткого понимания механизма привлечения комплекса избирательно на X-хромосому. Также остаётся невыясненной конкретная функция нкРНК, хотя отсутствие обеих roX РНК приводит к летальности самцов. Нами была поставлена задача изучить влияние деградации РНК на состав комплекса.

Материалы и методы. Нами было проведено ультрацентрифугирование ядерного лизата из S2 клеток в сахарозном градиенте с последующим отбором фракций. Фракции анализировались вестерн-блотом на присутствие различных компонентов комплекса. Полученные результаты сравнивались между интактным лизатом и лизатами, обработанными различными РНКазами. Затем результаты были подтверждены ко-иммунопреципитацией.

Результаты. При ультрацентрифугировании интактного лизата все компоненты комплекса колокализуются в тяжёлых фракциях (приблизительно 40S). При деградации РНК большинство компонентов комплекса переходит в промежуточные фракции, а два белка (РНК-хеликаза MLE и белок с цинковыми пальцами CLAMP) оказываются исключительно в лёгких фракциях. При большей деградации РНК наблюдается переход этих белков в ещё более лёгкие фракции. Была проведена реципрокная ко-иммунопреципитация за MSL1 и CLAMP, подтвердившая РНК-зависимое взаимодействие CLAMP с MSL-комплексом.

Выводы. Нами было показано, что длинная некодирующая РНК roX необходима для взаимодействия MSL-комплекса с белком CLAMP. При этом всё больше исследований указывает на возможную ключевую роль CLAMP в привлечении комплекса на X-хромосому. Это может прояснить жизненно важную роль roX, которая, согласно нашей модели, выступает в роли необходимого элемента, стабилизирующего контакт CLAMP и остального комплекса.

M14. Влияние дисфункции когезина на структурную организацию хроматина

Е.Д. Рюмина (*ryu-ekaterina@yandex.ru*), С.Ю. Сосновская (*sophie2811@mail.ru*)
Факультет биоинженерии и биоинформатики, биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова,

Введение: Когезин — это белковый комплекс, две субъединицы которого принадлежат SMC-семейству, осуществляющий когезию сестринских хроматид и участвующий в пространственной организации, конденсации и сегрегации.

ции хромосом, репарации двуцепочечных разрывов ДНК и регуляции экспрессии генов. Функции когезина связаны со способностью удерживать вместе два участка ДНК. Главную роль в привлечении когезина к ДНК играет комплекс Nipbl/Mau2 [1]. Мутации в гене NIPBL приводят к когезинопатиям, например синдрому Корнелии де Ланге (CdLS). В последнее время растет число доказательств того, что непосредственной причиной CdLS является нарушение регуляции экспрессии генов [2]. По предварительным данным эффективность репликативного мечения в мутантных по NIPBL клетках ниже, чем в клетках дикого типа. Возможное объяснение — замедление S-фазы.

Цель исследования — изучение влияния мутации в NIPBL на организацию сестринских хроматид в интерфазе и продолжительность S-фазы.

Материалы и методы: Для визуализации репликативных паттернов в клетках дикого типа и мутантных проводилось репликативное мечение EdU с разным временем фиксации, проявлением с помощью click-химии [3] и иммуногистохимическим окрашиванием. Проводилась автоматизированная широкопольная съемка препаратов и микроскопия суперразрешения SIM.

Результаты: Длительности G_2 - и S-фаз рассчитаны по числу митозов с яркостью метки выше пороговой («меченных» митозов) на препаратах с разным временем фиксации. Получены структуры репликативных паттернов (на уровне разрешения SIM).

Выводы. Полученная длительность S-фазы клеток дикого типа и мутантных примерно одинакова. У мутантов максимальный процент «меченных» митозов меньше, что может означать задержку некоторых клеток в G_2 . Это можно объяснить нарушением функции когезина — репарации ДНК. На одной из культур мутантных клеток наблюдалась гомогенное распределение метки, не соответствующее ни одному репликативному паттерну, однако на прочих культурах паттерны соответствовали стандартным. Данный феномен еще предстоит изучить.

Список литературы.

1. M. Carretero, S. Remeseiro, A. Losada, *Current opinion in cell biology*. **22**, 781–787 (2010).
2. J. Liu, I. Krantz, *Clinical genetics*. **76**, 303–314 (2009).
3. X. Deng *et al.*, *Current Biology*. **26**, 2527–2534 (2016).

М15. Влияние 3D-конструкций из поли-3-оксибутирата на активацию дифференцировки МСК в остеогенном направлении

Д.В. Чеснокова (chdaryana@gmail.com)

Кафедра биоинженерии биологического факультета, МГУ им. М.В. Ломоносова

Введение. При культивировании мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) важным аспектом является правильный подбор условий, способных повлиять на дифференцировку в специализированные клетки различных тканей. Поверхность субстрата играет важную роль для монослойной культуры МСК, поскольку интегринные фокальные контакты, ответственных за прикрепление, чувствительны к химическому составу и топографии субстрата и могут активировать

внутриклеточные сигнальные пути, регулирующие пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. Согласно литературным данным, пористая поверхность из поли-3-оксибутирата (ПОБ) может стимулировать МСК к дифференцировке в остеогенном направлении, что может быть использовано для регенерации костной ткани.

Материалы и методы. В ходе данной работы исследовалось влияние поверхности подложки из ПОБ на активацию сигнального пути, ведущего к дифференцировке МСК в остеогенном направлении, посредством измерения активности щелочной фосфатазы по реакции дефосфорилирования р-нитрофенилфосфата с образованием р-нитрофенола, полученные значения нормировались на содержание в образцах общего белка, измеренного методом Бредфорда. В качестве подложки для роста МСК использовались два типа 3D-конструкций из пористых микросфер со средним диаметром 170 и 600 мкм, иммобилизованных на плёнке. Микросферы получали из ПОБ путем двухэтапного эмульгирования, в качестве порообразователя использовался карбонат аммония. Образцы также исследовались в остеогенной среде для контроля способности МСК к дифференцировке.

Результаты. На обоих типах подложек при культивации и в стандартной ростовой среде, и в остеогенной среде не было обнаружено значимого увеличения активности щелочной фосфатазы. При этом у клеток, которые росли на культуральном пластике, возрастала активность щелочной фосфатазы при культивировании в остеогенной среде.

Выводы. При сравнении значений активности щелочной фосфатазы с отрицательным контролем, можно предположить, что изучаемые виды подложек не индуцируют остеогенной дифференцировки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00196.

М16. Серотонин повышает чувствительность мезенхимных стромальных клеток к норадреналину

*В.И. Чечехин (v-chech@gmail.com), А.М. Иванова, П.А. Тюрин-Кузьмин
Кафедра биохимии и молекулярной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова*

Введение. Мезенхимные стромальные клетки (МСК) выявляются в большинстве тканей организма и играют ключевую роль в процессах репарации, регенерации и поддержании гомеостаза. Функциональная активность МСК регулируется гормонами и нейромедиаторами, а одним из ключевых является норадреналин. Ранее мы показали, что при стимуляции сигнального пути бета-адренорецепторы/Gs-белок/аденилатциклаза/цАМФ через 6 часов происходит повышение уровня экспрессии альфа1A-адренорецепторов и, как следствие, повышение чувствительности МСК к этому гормону.

Материалы и методы. МСК, выделенные из жировой ткани человека; ПЦР; Вестерн-блоттинг, ингибиторный анализ, иммунофлуоресцентный анализ.

Результаты. Путем анализа сигнальных путей, активируемых основными нейромедиаторами, мы выбрали следующие нейромедиаторы, рецепторы которых

могут активировать аденилатциклазу: дофамин, гистамин, серотонин, аденозин. Методом ПЦР мы установили, что в МСК экспрессируются мРНК рецепторов A2a, A2b, DRD1, DRD5, HRH2, HTR6, HTR7. Для проверки влияния выбранных нейромедиаторов на функциональную активность МСК мы установили, что серотонин, так же как и норадреналин, повышает число клеток, отвечающих на норадреналин кальций-зависимым путем. Гистамин, дофамин и аденозин - не изменяют. Для выяснения механизма обнаруженного феномена мы проверили, изменяется ли уровень белка альфа1А-адренорецепторов после стимуляции клеток серотонином. Путем вестерн-блоттинга мы установили, что через 6 часов после преинкубации с серотонином в МСК повышается уровень экспрессии альфа1А-адренорецепторов. Кроме того, мы выяснили сигнальные механизмы гетерологической сенситизации альфа1А-адренорецепторов. Мы показали с помощью ингибиторного анализа и иммуноферментного анализа, что серотонин и норадреналин активируют аденилатциклазу, синтез цАМФ и протеинкиназу А. Нейромедиаторы, не вызывающие гетерологической сенситизации, ингибируют аденилатциклазу, несмотря на то что имеют изоформы рецепторов, сопряженные с Gs-белком.

Выводы. Таким образом, сопряжение адренергических рецепторов с кальциевой сигнализацией в МСК специфически регулируется норадреналином и серотонином.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00421.

M17. Характеристики NG2 как клеточного маркера перестроек гена *KMT2A*

А.Л. Читанова (79199645105@ya.ru), О.И. Илларионова, П.С. Бусурин, И.А. Демина, Е.А. Зеркаленкова, А.М. Попов

Лаборатория клеточной иммунологии и иммуногенеза, НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева

Введение. Перестройки гена *KMT2A*, связаны с острым лимфобластным (ОЛЛ) и с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). Ген *KMT2A* имеет около 100 партнеров для перестроек. Поверхностный маркер NG2, применяемый в проточной цитометрии, считается наиболее подходящим для идентификации ОЛЛ и ОМЛ, связанных с перестройками *KMT2A*. Целью данного исследования было оценить предсказательную ценность NG2 для *KMT2A* перестроек в различных группах пациентов с острым лейкозом в возрасте до 18 лет.

Материалы и методы. Мы проанализировали 269 детей в возрасте до 18 лет (162 с ОЛЛ, 107 с ОМЛ). Перестройки *KMT2A* были обнаружены с помощью цитогенетических методов у 85 детей с ОЛЛ (52,5%) и 71 (66,4%) с ОМЛ. Пациенты были разделены на четыре группы: пациенты с ОЛЛ до года (n = 53); пациенты с ОЛЛ 1-18 лет (n = 109); пациенты с ОМЛ до года (n = 23); пациенты с ОМЛ 1-18 лет (n = 84). Экспрессия NG2 определялась с помощью проточной цитометрии (BD FACSCantoII). Используя ROC-анализ, мы нашли наиболее подходящий уровень NG2, для того чтобы классифицировать пациентов на NG2+ и NG2- группы.

Результаты. Максимальной суммой специфичности и чувствительности обладают следующие пороги: 5% NG2-экспрессирующих клеток (специфичность 1,00 и чувствительность 0,96) для детей с ОЛЛ и 10% для детей ОМЛ в возрасте до одного года (специфичность 1,00 и чувствительность 0,84); 11% уровень NG2 при ОЛЛ (0,853

специфичность и 0,747 чувствительность) и 13% NG2 при ОМЛ (0,750 специфичность и 0,758 чувствительность) для детей 1-18 лет.

Выводы. Предсказательная значимость NG2 зависит от типа лейкоза и возраста пациента. Наличие NG2 на клетке имеет большую клиническую значимость.

М18. Взаимосвязь eIF4G2 и PCBP2 в регуляции трансляции друг друга

Е.Д. Шестакова¹ (shestakovabio@yandex.ru), В.В. Смирнова^{2,3}, Д.В. Бикметов², И.Н. Шатский^{2,3}, И.М. Теренин^{2,3,4}

¹Кафедра биохимии, биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

² Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова

³ НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского

⁴ Первый МГМУ им. Сеченова

Введение. полицитидинсвязывающие белки (PCBP) являются одними из самых распространенных белков в клетках млекопитающих. Известно, что PCBP2, существующий в 7 изоформах, принимает участие в регуляции транскрипции и трансляции мРНК, влияют на стабилизацию ее 3'-конца и процессинг. Однако до сих пор связывание PCBP2 с 5'-нетранслируемыми областями (НТО) клеточных мРНК и функциональные различия между изоформами PCBP2 не были исследованы. Наличие высококонсервативного контекста неканонического старт-кодона (GUG) в мРНК фактора инициации трансляции eIF4G2 свидетельствует о возможной посттранскрипционной регуляции данного гена РНК-связывающими белками.

Материалы и методы. методы генной инженерии, *in vitro* транскрипция РНК, *in vitro* трансляция, РНК пулл-даун, экспрессия рекомбинатных белков в *E.coli*, РНК-интерференция, РНК-трансфекция клеточных культур эукариот.

Результаты. 5'НТО от мРНК eIF4G2 связывает изоформу PCBP2f, а 5'НТО от мРНК CCN1 связывает *in vitro* как PCBP2f, так PCBP2e. Удаление CU-богатого участка из 5'НТО eIF4G2 делает такую РНК нечувствительной к PCBP2. Рекомбинантный PCBP2e снижает эффективность трансляции с репортерной мРНК с 5'НТО CCN1, а PCBP2f подавляет трансляцию с мРНК с 5'НТО CCN1 и eIF4G2. Нокдаун PCBP2 в клетках 293T и Huh7 приводит к усилению трансляции репортерных мРНК с 5'НТО CCN1 и eIF4G2. При этом нокдаун eIF4G2 в клетках 293T, Huh7 и NIH3T3 приводит к ослаблению трансляции репортерных мРНК с 5'НТО PCBP2 и CCN1. Нокдаун eIF4G2 снижает уровень PCBP2 в клетках.

Выводы. Белки PCBP2 и eIF4G2 на формируют отрицательную петлю обратной связи на посттранскрипционном уровне, что является возможным механизмом регуляции их количества в клетках. PCBP2 и eIF4G2 независимо друг от друга влияют на трансляцию мРНК CCN1.

Работа поддержана грантами РФФИ №16-14-10065 и РФФИ №16-04-01628 (*in vitro* эксперименты).

M19. Изучение трансляционных событий на стоп-кодонах репортёрных мРНК в бесклеточной системе

В.И. Шлык^{1,2}, А.С. Куценко^{1,3}, К.А. Акулич^{1,4}, С.Е. Дмитриев (sergey.dmitriev@belozersky.msu.ru)^{1,3,4,5}, В.Н. Гладышев^{1,6}

¹Научно-исследовательский институт Физико-Химической Биологии им. А.Н. Белозерского

²Кафедра молекулярной биологии, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

³Кафедра биохимии Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

⁴Факультет Биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова

⁵Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН

⁶Больница Бригам энд Уоменс, Бостон, Массачусетс

Введение. Одним из ключевых этапов биосинтеза белка в клетке является терминация трансляции. На сегодняшний день существуют сложности, связанные с изучением этой стадии, поэтому целью работы являлась разработка системы на основе оригинального набора репортёрных мРНК, который позволит оценить эффективность и скорость терминации трансляции в эукариотической бесклеточной системе.

Материалы и методы. Соответствующий участок гена люциферазы был наработан с помощью ПЦР. Далее с обеих конструкций с помощью *in vitro* транскрипции получены мРНК, которые при инкубации в бесклеточной системе трансляции на основе клеток асцитоканциномы мыши давали активный продукт. Активность люциферазы измерялась котрансляционно, фиксировалось количество продукта и время его появления.

Результаты. Созданы молекулярно-генетические конструкции, которые кодируют люциферазу светлячка с и без довеска на С-конце. Молекула люциферазы без довеска приобретает активность только после терминации, поскольку её С-концевой участок, «спрятанный» в рибосомном тоннеле, необходим для сворачивания активной белковой глобулы. Наличие С-концевого довеска достаточной длины позволяет новосинтезированной молекуле люциферазы появиться из тоннеля и свернуться до отделения от рибосомы. С помощью конструкций было проанализировано влияние длины 3'НТО мРНК, слабого терминационного контекста, обеспечивающего высокую эффективность сквозного прочтения, а также протестированы прокариотический ингибитор терминации трансляции бластицидин S и доминант-негативный мутант фактора терминации eRF1 (AGQ eRF1), который не способен гидролизовать пептидил-тРНК.

Выводы.

1. Разработана система, с помощью которой можно оценивать скорость и эффективность терминации трансляции в различных условиях.
2. 10 п.н. в 3'НТО недостаточно для эффективной терминации трансляции.
3. Контекст стоп-кодона, обеспечивающий высокую частоту сквозного прочтения, снижает скорость терминации трансляции.
4. Бластицидин не обладает специфичностью по отношению к терминации трансляции.
5. eRF1 AGQ мутант ингибируют элонгацию трансляции.

M20. Ингибирование пролиферации HER2/neu-позитивных клеток моноклональными антителами сопровождается снижением экспрессии генов альдегиддегидрогеназ

П.С. Шпудейко (*pshpudeiko@gmail.com*)

Факультет Биоинженерии и Биоинформатики Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова

Введение. Трастузумаб, терапевтическое антитело, узнающее онкобелок HER2/neu на поверхности клеток рака молочной железы человека, с высокой эффективностью подавляет рост опухоли. Рак молочной железы, как и другие типы рака, зачастую характеризуется повышенной активностью альдегиддегидрогеназы (ALDH), что считается плохим прогностическим признаком. ALDH – это фермент, окисляющий альдегиды, и одним из его субстратов являются ацетальдегид и формальдегид (ФА). Нормально функционирующие клетки характеризуются наличием в цитоплазме физиологических количеств ФА. Однако за счет повышения общего уровня метаболизма в раковых клетках происходит увеличение концентрации ФА, а также растет скорость его удаления, что позволяет избежать клеточной смерти, индуцируемой большим количеством эндогенного ФА.

Материалы и методы. Исследования проводились на клеточной линии BT474, характеризующейся повышенной экспрессией онкогена *HER2/neu*. Для определения уровня мРНК исследуемых генов использовалась количественная ПЦР, предваряемая реакцией обратной транскрипции (ОТ-кПЦР), а для оценки метаболической активности клеток – МТТ-тест.

Результаты. С помощью ОТ-кПЦР было обнаружено, что добавление к клеткам BT474 трастузумаба сопровождается подавлением в них экспрессии гена *ALDH2*, кодирующего альдегиддегидрогеназу митохондрий. Обработка культуры клеток ингибитором ALDH дисульфирамом вызывала значительное снижение уровня пролиферации по результатам МТТ-теста, а также увеличение доли клеток, претерпевающих апоптоз. При этом наблюдалось повышение концентрации формальдегида в культуральной среде. И дисульфирам, и трастузумаб вызывают изменение активности ALDH, ключевого фермента метаболизма формальдегида. В результате концентрация эндогенного формальдегида может повышаться, что и приводит к торможению деления HER2/neu-позитивных клеток рака молочной железы человека и последующей их гибели.

Выводы. Снижение экспрессии и активности ALDH в HER2/neu-позитивных клетках рака молочной железы человека в ответ на воздействие трастузумаба или дисульфирама является одним из механизмов, индуцирующих гибель клеток в результате повышения концентрации эндогенного формальдегида.

M21 Роль ядерной ламины при миграции клеток: связь со старением и опухолевой прогрессией

А.С. Юдина (*uidna98@gmail.com*)¹, С.В. Лаврушкина², Н.Л. Овсянникова^{1,3}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ имени М.В. Ломоносова

²Кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета, МГУ имени М.В. Ломоносова

³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

Введение. Поиск способов контроля миграции метастатических клеток является одной из актуальных задач в области практической биохимии и молекулярной биологии. Одним из способов контроля миграции может стать контроль эластических свойств клеточного ядра, поскольку именно ядро, являясь самым крупным и жестким компартментом, определяет пластичность всей клетки. При этом жесткость ядра определяет ядерная ламина (ЯЛ), двумерная сеть промежуточных филаментов, расположенная на внутренней ядерной мембране. Изменение соотношения ее основных структурных компонентов – ламинов типа А и В, по-видимому, является ключевым фактором, определяющим механическую пластичность клеточного ядра.

Также известно, что накопление в ЯЛ прогерина, мутантной формы ламина А, экспрессируемого при синдроме Хатчинсона-Гилфорда и при нормальном старении, приводит к увеличению жесткости ядра. Однако, как влияет наличие прогерина и изменение соотношения ламинов в ЯЛ на процесс клеточной миграции до сих пор неясно.

Материалы и методы. Трансфекцией клеток линии НТ1080 (фибросаркома человека) были получены гетерогенные культуры, экспрессирующие ламин А-GFP, прогерин-GFP и шпилечную РНК, специфично подавляющую экспрессию ламина А.

Миграционную способность оценивали, используя модель экспериментальной раны и мембраны с размером пор 3 и 8 мкм (камера Бойдена).

Результаты. Изменение состава ЯЛ никак не влияет на миграцию в неограниченном пространстве (модель экспериментальной раны). Дополнительная экспрессия ламина А и прогерина снижает эффективность миграции клеток через фильтры с порами размером 3 мкм. При этом при подавлении синтеза эндогенного ламина А значительных изменений в активности миграции не наблюдается.

Выводы. Эффективность миграции зависит от присутствия изоформ ламина А. Наличие мутантной формы ингибирует ее активность. Терапевтическое воздействие на постпроцессинг ламина А может стать перспективным методом подавления метастазирования опухолевых клеток.

Выполнено при поддержке РФФ (№ 17-15-01290).

Секция «Физиология и медицинская биохимия»

Ф1. Долговременные эффекты регуляторов дегидрогеназ 2-оксокислот на метаболизм коры головного мозга крыс в норме и после спинномозговой травмы

А.И. Бойко (boiko.sash@gmail.com), П.М. Цепкова, А.В. Артюхов, В.А. Алешин, А.В. Казанцев, А.Л. Ксенофонтов, С.И. Рябов, Н.В. Лукашев, А.В. Граф, В.И. Буник

Отдел биокинетики НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова

Введение. Тяжелые травмы спинного мозга вызывают хроническое воспаление и дисфункцию головного мозга. Травма головного мозга инактивирует тиаминдифосфат-зависимый комплекс 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ОГДГ), участвующий в выработке энергии и метаболизме нейромедиаторов. Цель данной работы – исследовать эффекты тяжелой спинномозговой травмы (СМТ) и регуляции ОГДГ и 2-оксоадипатдегидрогеназы (ОАДГ) на метаболический профиль коры головного мозга, активности регулируемых дегидрогеназ и ассоциированных ферментов центрального метаболизма.

Материалы и методы. В работе использовали крыс Sprague Dawley и опубликованные протоколы моделирования контузионной СМТ, оценки реабилитации, количественного анализа метаболитов и ферментов в коре мозга [1-4]. Предшественник кофермента ОГДГ и ОАДГ тиамин и биодоступные формы ингибиторов данных дегидрогеназ – фосфоновых аналогов 2-оксоадипата и 2-оксопимелата – вводили в течение суток после травмы. Животных декапитировали после 8 недель реабилитации.

Результаты. Введение фосфонатов вызывало компенсаторную активацию ОГДГ у контрольных животных, препятствуя инактивации ОГДГ после СМТ. Активность ОАДГ снижалась после СМТ и/или введения фосфонатов и коррелировала с баллами реабилитации. Эффект фосфонатов на метаболический профиль интактных крыс был аналогичен эффекту СМТ, усиливая вызываемые СМТ изменения при совместном действии. Введение после СМТ тиамина активировало ОГДГ и ОАДГ, сглаживало различия метаболических профилей травмированных и интактных крыс и улучшало реабилитацию животных. Кластеризация метаболических профилей и активностей ферментов в норме и патологии показала сопряженность изменений ОГДГ, малик-фермента, аланина и серина как у интактных животных, так и после СМТ. Сопряжение активности ОАДГ с уровнями серосодержащих метаболитов и маркеров генерации окиси азота возрастало у животных после СМТ.

Выводы. Показана роль дисфункции ОГДГ и ОАДГ головного мозга в последствиях СМТ. Предотвращение дисфункции тиамином улучшало реабилитацию после СМТ. Введение ингибиторов ОГДГ и ОАДГ усиливало индуцируемые СМТ изменения головного мозга.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00116).

Список литературы.

1. D. M. Basso, M. S. Beattie, J. C. Bresnahan, *Exp. Neurol.* **139**, 244–256 (1996).
2. A. Boyko et al., *Front Med (Lausanne)*. **4**, 249 (2017).
3. A. Ksenofontov et al., *Biochemistry (Moscow)*. **82**, 1183–1192 (2017).
4. P. M. Tsepikova et al., *Biochemistry Mosc.* **82**, 723–736 (2017).

Ф2. Особенности влияния амитриптилина на внутриклеточные кальциевые ответы в кортикальных нейронах

С.И. Бойков^{1,2} (sergei-boickov@mail.ru), Д.А. Сибаров²

¹ Кафедра «Медицинская физика» Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого

² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Введение. По механизму действия исследуемый трициклический антидепрессант амитриптилин относится к неселективным блокаторам обратного захвата моноаминов, имеет сродство к мускариновым, гистаминовым и α_1 -, α_2 -адренорецепторам. Также известно, что амитриптилин блокирует трансмембранные токи NMDA-рецепторов и модулирует функции внутриклеточных IP3 рецепторов. Поэтому целью данной работы стало исследование модуляции амитриптилином внутриклеточных кальциевых ответов в нейронах, наблюдаемых при активации NMDA-рецепторов.

Методы. Эксперименты выполнены на первичной культуре нейронов коры головного мозга крыс на 2-3 недели созревания *in vitro*. Изменения концентрации внутриклеточного кальция в ответ на стимулы оценивали по флуоресценции кальций-зависимого красителя Fluo8, регистрируемой на конфокальном микроскопе Leica SP5 MP при возбуждении голубым лазером.

Результаты. В малых концентрациях (10 мкМ) амитриптилин не блокировал вызываемые NMDA (100 мкМ) кальциевые ответы, однако в больших концентрациях (200 мкМ) значительно подавлял вход кальция в клетку через каналы NMDA-рецепторов.

В концентрации 200 мкМ в безкальциевой среде амитриптилин сам по себе вызывал транзиторные кальциевые ответы нейронов в результате выхода кальция из внутриклеточных депо. Тем не менее, в присутствии внеклеточного кальция блокада IP3-рецепторов при помощи 2-APB достоверно не влияла на степень ингибирования амитриптилином кальциевых ответов нейронов на NMDA.

Выводы. В высоких концентрациях амитриптилин является блокатором NMDA-рецепторов, снижающим поступление кальция внутрь клетки через пору NMDA-рецептора. Малые концентрации, характерные для терапевтических доз препарата, не оказывают существенного влияния на вход кальция через NMDA-рецепторы. Вклад IP3-зависимого выхода кальция из внутриклеточных депо при действии амитриптилина не оказывает существенного эффекта на общий вход кальция через NMDA-рецепторы.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-015-00023.

Ф3. Влияние диеты с повышенным содержанием глюкозы на IgA-опосредованный иммунный ответ у мышей

М.А. Бондарева¹ (maa.bondareva@gmail.com), Я.К. Сёмин¹, А.А. Круглов^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова

²German Rheumatism Research Center (DRFZ), a Leibniz Institute, Berlin, 10117 Germany

Введение. Кишечная микробиота вовлечена в поддержание гомеостаза организма-хозяина, контроль иммунного ответа, метаболизм; различные компоненты микробиоты могут быть ассоциированы с некоторыми заболеваниями. Поэтому важно контролировать состав микробиоты. Одним из основных механизмов контроля состава микробиоты является продукция иммуноглобулина А (IgA) плазматическими клетками кишечника. Однако механизмы IgA-опосредованного взаимодействия между микробиотой и организмом-хозяином остаются невыясненными. Более того, значительная часть исследований посвящена проблеме влияния внешних факторов, к которым, например, относятся модификации макрокомпонентов пищи, на контроль микробиоты. В связи с этим была поставлена цель оценить влияние изменения углеводного макрокомпонента рациона на IgA-опосредованный иммунный ответ у мышей.

Материалы и методы. В экспериментах *in vivo* использовались мыши дикого типа линии C57Bl/6, которые в течение 30 дней потребляли 20% раствор глюкозы *ad libitum*. У животных оценивался уровень IgA в сыворотке и в фекалиях методом иммуноферментного анализа, а также было оценено содержание IgA⁺ плазматических клеток методом проточной цитофлуориметрии. Для изучения транскитоza IgA *in vitro* была использована линия мышинных эпителиальных клеток CMT93.

Результаты. Повышенное потребление глюкозы приводило к возрастанию уровня системного IgA, однако не оказывало влияния на продукцию люминального IgA. Цитофлуориметрический анализ показал, что данный фенотип в сыворотке не ассоциирован с повышенным содержанием IgA-продуцирующих клеток в различных компартментах. Анализ методом вестерн-блот показал, что глюкоза индуцирует повышенную продукцию димерного IgA в сыворотке. Дальнейший *in vitro* анализ транскитоza IgA с использованием сыворотки мышей, не выявил разницы между контрольной и экспериментальной группами.

Выводы. Таким образом, углеводный макрокомпонент важен в регуляции количества димера IgA в сыворотке, при этом не влияет на индукцию IgA-продуцирующих клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-74-20059.

Ф4. Оценка цитохром P450 3A4-зависимых межлекарственных взаимодействий противоопухолевого препарата абиратерона и макролидного антибиотика эритромицина

Я.И. Гавриченко (yar-12@mail.ru), Р.А. Масамрех, А.В. Кузиков, В.В. Шумянцева

Кафедра биохимии медико-биологического факультета Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова

Введение. Межлекарственные взаимодействия могут являться причиной ряда серьёзных побочных эффектов. Цитохром P450 3A4 (CYP3A4) метаболизирует более

50% всех лекарственных препаратов, что может приводить к развитию побочных эффектов при комплексной фармакотерапии за счёт межлекарственных взаимодействий на уровне этого изофермента цитохрома P450. Абиратерон является препаратом первой линии при лечении рака простаты, однако его взаимодействие с другими лекарственными средствами изучено недостаточно. Целью настоящей работы является изучение взаимодействия абиратерона с макролидным антибиотиком эритромицином в CYP3A4-зависимых каталитических реакциях.

Материалы и методы. Взаимодействие абиратерона с активным центром CYP3A4 было изучено методом дифференциальной спектроскопии. В работе были использованы электрохимические системы на основе иммобилизованного CYP3A4. Определение метаболитов CYP3A4-зависимых реакций проводилось методами масс-спектрометрии и спектрофотометрии.

Результаты. Исследованы CYP3A4-зависимые межлекарственные взаимодействия противоопухолевого препарата абиратерона и макролидного антибиотика эритромицина. Методом дифференциальной абсорбционной спектроскопии показано, что абиратерон взаимодействует с CYP3A4 по II («ингибиторному») типу, при этом зависимость спектральных изменений CYP3A4 от концентрации абиратерона имеет сигмоидный характер, указывающий, по-видимому, на кооперативное взаимодействие CYP3A4 с абиратероном. Значения константы диссоциации комплекса CYP3A4-абиратерон и коэффициента Хилла были определены как $3,8 \pm 0,1$ мкМ и $2,3 \pm 0,2$, соответственно. С помощью электрохимической ферментной системы на основе CYP3A4, иммобилизованного на печатном графитовом электроде, показано, что абиратерон проявляет слабые свойства конкурентного ингибитора с эффектом частичного торможения N-деметилазной активности CYP3A4 по отношению к эритромицину. Эритромицин и его метаболиты не влияют на процесс гидроксирования абиратерона под действием CYP3A4.

Выводы. Не выявлено выраженного межлекарственного взаимодействия противоопухолевого препарата (абиратерона) и макролидного антибиотика (эритромицина) на уровне CYP3A4, что указывает на безопасность их совместного применения в комплексной фармакотерапии.

Ф5. Эндокринные нарушения у крыс при морфиновой интоксикации

В.О. Ганецкая (viktoria1234525@mail.ru)

Кафедра клинической лабораторной диагностики и иммунологии

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь

Введение. Морфин является опиоидным анальгетиком, применяемым при травмах и различных заболеваниях, при подготовке к операциям и в послеоперационный период, при некоторых формах бессонницы и т.д. Учитывая распространенность немедикоментозного употребления данного наркотика, представляется важным изучение влияния острой морфиновой интоксикации на эндокринную деятельность щитовидной и поджелудочной желез.

Материалы и методы. Морфин крысам водили в дозах 10 мг/кг, 20 мг/кг, 40 мг/кг. В крови исследовали уровень инсулина и тиреоидных гормонов.

Результаты. Введение морфина в дозе 10 мг/кг приводило к изменению тиреоидного статуса: содержание тироксина в сыворотке крови резко возрастало (увеличивалось в 2,6 раза в сравнении с контролем). Концентрация инсулина в крови не изменялась. Умеренная морфиновая интоксикация (20 мг/кг) сопровождалась существенными изменениями функционального статуса щитовидной железы, а именно – увеличением содержания тироксина в сыворотке крови в 2,9 раза по сравнению с контролем. Однако при этом не было отмечено статистически значимых изменений уровня инсулина в крови. При введении морфина в дозе 40 мг/кг отмечалось изменение функциональной активности щитовидной железы, которая проявлялась и при меньшей дозе наркотика. Уровень тироксина при введении большой дозы морфина повышался. В данных экспериментальных условиях отмечалось снижение концентрации инсулина в сыворотке крови на 53%.

Выводы. Острая морфиновая интоксикация приводит к эндокринным нарушениям в организме, что проявляется изменениями уровней ряда гормонов щитовидной и поджелудочной желез в крови.

Ф6. В мозге взрослых крыс, подвергшихся пренатальной гипоксии, повышен уровень триптофана и ослаблены гомеостатические механизмы

Е.Ю. Данилова (phenolyat@gmail.com), А.В. Артюхов, А.В. Граф, А.Л. Ксенофонтов, А.В. Казанцев, П.М. Цепкова, С.А. Зарубина, А.А. Пометун, Н.В. Лукашев, В.И. Буник

Отдел биокинетики научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского

Введение. Пренатальная гипоксия оказывает пагубное влияние на формирование мозга и его функционирование во взрослом состоянии. Целью данной работы является исследование молекулярных механизмов действия пренатальной гипоксии путем характеристики биохимических показателей мозга самцов и самок крыс и реактивности этих показателей к метаболическому стрессу.

Материалы и методы. Крыс подвергали воздействию острой гипобарической гипоксии на 20-й день беременности. Метаболический стресс у животных моделировали на 80-й день жизни интраназальным введением глутарилфосфоната – синтетического ингибитора дегидрогеназ 2-оксоглутарата (ОГДГ) и 2-оксоадипата (ОАДГ) [1]. Животных декапитировали через 24 ч после этой обработки. Приготовление экстрактов и гомогенатов коры мозга для количественного определения в них метаболитов и ферментативных активностей, соответственно, проводили согласно опубликованным протоколам [1-4]. Содержание НАД⁺ измеряли ферментативно с помощью рекомбинантной формиатдегидрогеназы. Статистическую обработку проводили двухфакторным АНОВА.

Результаты. Независимо от пола животных, пренатальная гипоксия увеличивала уровень триптофана и его реактивность к глутарилфосфонату; при этом уровни НАД⁺, глутамата, аспартата, фенилаланина, тирозина и гамма-аминомасляной кислоты не изменялись, но реактивность гамма-аминомасляной кислоты к стрессору возрастала. У подвергшихся пренатальной гипоксии самок наблюдали эффект увеличения реактивности к глутарилфосфонату также и по уровню НАД⁺. Кроме того, пренатальная гипоксия приводила к появлению значимых гендерных различий в активности ОГДГ, но устраняла таковые в реактивности ОАДГ к глутарилфосфонату.

Выводы. Пренатальная гипоксия вызывает долгосрочные биохимические изменения мозга крыс и его ответа на метаболический стресс, причем для таких изменений характерны гендерные отличия.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда № 18-14-00116.

Список литературы.

1. V. I. Bunik et al., 19th Tetraheron Symposium, Riva del Garda, Italy, 2018.
2. P. Tsepkova et al., *Biochemistry (Moscow)*. **82**, 723–736 (2017).
3. W. D. Denckla, H. K. Dewey, *J. Lab. Clin. Med.* **69**, 160–169 (1967).
4. D. L. Bloxam, W. H. Warren, *Anal. Biochem.* **60**, 621–625 (1974).

Ф7. Экспрессия гена рецептора орексина первого типа (Ox1R) в период абстиненции у алкоголизованных крыс

С.О. Ереско (*interleukin1b@gmail.com*)¹, М.И. Айрапетов^{2,3}, Э.А. Сексте², Е.Р. Бычков², А.А. Лебедев², П.Д. Шабанов^{1,2,4}

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

²Институт экспериментальной медицины, Россия, Санкт-Петербург

³Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Россия, Санкт-Петербург

⁴Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург

Введение. Было доказано, что система орексина участвует в механизмах алкогольной аддикции, способствуя активации механизмов, направленных на поиск алкоголя в период абстиненции. Известно, что OX1R экспрессируется преимущественно в эмоциогенных структурах мозга – префронтальной коре, гиппокампе, вентральной области покрышки, но особая роль каждого подтипа рецептора к орексинам в условиях отмены алкоголя остаётся спорной, что и послужило целью данной работы.

Материалы и методы. Использованы 40 крыс-самцов линии Вистар. Крыс подвергали полунасильственной алкоголизации 15%-ным раствором этанола в течение 6 месяцев, контрольная группа крыс получала воду. На первые и седьмые сутки абстиненции крыс декапитировали. Выделение тотальной РНК проводили с использованием TRIzol («Ambion», США). Синтез кДНК проводили с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы (M-MuLV обратной транскриптазы, «Promega», США). ПЦР с детекцией в режиме реального времени («Mx3005P», «Stratagene», США) проводили в смеси, содержащей SYBR Green («Синтол», Россия), смесь специфических прямых и обратных праймеров («Beagle», Россия). Полученные данные нормированы к уровню экспрессии гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Для сравнения групп использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

Полученные результаты. Уровень мРНК OX1R достоверно снизился в префронтальной коре на 1-ый и 7-ой дни отмены этанола в сравнении с группой контроля. В гиппокампе получены противоположные результаты, где наблюдали достоверное увеличение уровня мРНК OX1R на 1-ый и 7-ой дни отмены этанола. В условиях наших опытов в вентральной области покрышки уровень мРНК OX1R у групп абстиненции на 1-ый и 7-ой дни по отношению к группе хронической алкоголизации и к группе интактных животных не изменялся.

Выводы. Полученные результаты указывают на вовлеченность, прежде всего, префронтальной коры и гиппокампа в механизмы, опосредующие подкрепляющие эффекты потребления алкоголя.

Ф8. Динамика количества рецепторов дофамина 1 в лимфоцитах периферической крови на фоне антипсихотической терапии

А.С. Журавлев (rigold988@mail.ru), А.М. Заботина (a.zabotina@gmail.com), М.Н. Грунина (by2306@mail.ru), А.Е. Тараскина (ataraskina@mail.ru)

Лаборатория молекулярной генетики человека ОМРБ ПИЯФ им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»

Введение. Расстройства шизофренического спектра (РШС) - превалирующие психические расстройства, нуждающиеся в антипсихотической коррекции. Так как лимфоциты периферической крови (ЛПК) экспрессируют на мембране рецепторы дофамина (DR), вовлечены в периферическое звено патогенеза РШС и подвержены системному действию антипсихотиков, их в настоящее время рассматривают как адекватный инструмент монитора фармакокоррекции психически больных.

Цель исследования – оценка количества рецепторов дофамина D1 ЛПК как потенциального маркера развития психических расстройств и ответа на антипсихотическую терапию.

Материалы и методы. В исследование было включено 60 пациентов мужского пола с первично поставленным диагнозом РШС, 48 пациентов с коморбидным течением РШС и синдрома алкогольной зависимости и 40 лиц контрольной группы. Психически больных путем рандомизации отнесли к одной из групп терапии: оланзапин / галоперидол.

Материалом служили ЛПК. Определение количества D1R проводили с использованием набора ELISA (Cloud-Clone Corp, USA), с нормировкой на общий белок клеточного лизата. Результаты представлены в нг/мг.

Статистическая обработка данных проведена с использованием пакета программы SPSS версия 21.0 (IBM, USA).

Результаты. Достоверных различий в количестве белка DRD1 между группами психически больных до терапии (РШС и коморбидное течение заболевания) и контрольной группы выявлено не было ($p=0,254$). Показатели составили: 3,06 ($1,94\div 4,65$); 4,0 ($1,49\div 6,94$) и 2,29 ($1,49\div 5,09$) для трех сравниваемых групп, соответственно. В двух группах психически больных на фоне терапии галоперидолом наблюдалось достоверное снижение количества DRD1 до 0,69 ($0,02\div 2,03$) у пациентов с РШС и до 0,61 ($0,07\div 1,68$) при коморбидном течении заболевания ($p=0,001$), при терапии оланзапином статистически значимых изменений в показателях DRD1 зафиксировано не было ($p=0,248$).

Выводы. При терапии галоперидолом происходит снижение количества D1R в ЛПК, по всей видимости, ассоциированное с аффинитетом препарата терапии.

Ф9. Влияние фрагментов окисленной вкДНК на активность генов провоспалительных цитокинов в мононуклеарах периферической крови детей, страдающих расстройствами аутистического спектра

С.А. Канонирова (s.kanonirova@gmail.com), Ю.М. Чудакова, Н.В. Шаронова, Г.В. Шмарина, Е.С. Ершова, С.В. Костюк

Лаборатория молекулярной биологии, ФГБНУ «МГНЦ»

Введение. У пациентов с расстройствами аутистического спектра (РАС) обнаружены признаки истощения антиоксидантных систем. В условиях оксидативного стресса повышается уровень окислительной модификации внеклеточной (вк)ДНК. Окисленные фрагменты вкДНК могут активировать транскрипционный фактор NF- κ B, и, таким образом, повысить синтез провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками (МНК) периферической крови.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие 18 пациентов с РАС в возрасте 4-10 лет (F 84.02, 84.11 по МКБ-10). В контрольную группу вошли 11 здоровых детей того же возраста. МНК периферической крови выделяли в градиенте плотности фиколл-урографин. МНК инкубировали с фрагментами окисленной ДНК (50 нг/мл). По окончании инкубации из МНК выделяли РНК с использованием RNeasyPlusMini Kit ("Qiagen"). Обратную транскрипцию осуществляли реактивами «Силекс». Уровень экспрессии генов *NFKB1*, *ИЛ-8*, *ИЛ1 β* , *TNF α* оценивали методом ПЦР в реальном времени. Фрагменты окисленной ДНК получали при обработке образца геномной ДНК 300мМ H₂O₂ и ультрафиолетовым излучением, $\lambda = 312$ нм. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ».

Результаты. Через 3 часа после добавления фрагментов окисленной ДНК в культуру МНК уровень экспрессии генов *NFKB1* и провоспалительных цитокинов ИЛ-8, ИЛ1 β , *TNF α* возрастал в 2-4 раза как у детей с РАС, как и у контролей ($p < 0,01$). Через 24 часа в клетках контролей было отмечено снижение уровня экспрессии транскрипционного фактора *NFKB1* и провоспалительных цитокинов до исходного уровня. А в клетках детей с РАС уровни экспрессии генов *NFKB1*, *ИЛ-8*, *ИЛ1 β* , *TNF α* оставались повышенными даже через сутки после добавления в культуру фрагментов окисленной ДНК (все $p < 0,01$).

Выводы. Полученные данные показывают, что окисленные фрагменты вкДНК могут активировать и поддерживать системную воспалительную реакцию у пациентов с РАС.

Работа поддержана грантом РФФИ №17-04-01587А.

Ф10. Формирование модельного рубца: физико-химический анализ

Е.Д. Красавина¹ (ekrasavinaa@gmail.com), А.Ю. Капитанникова² (a.kapitannikova@gmail.com),

¹Кафедра физической химии, химический факультет, МГУ им. Ломоносова

²Кафедра биоинженерии и биоинформатики, институт фармации, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

Введение. Актуальной проблемой является разработка стратегии лечения рубцовых тканей, которая осуществляется на модельных рубцах определенного вида.

Целью работы является характеристика модельной рубцовой ткани для определения ее вида.

Материалы и методы. Рубцовая ткань зрелостью от 1 до 4 месяцев, сформированная после механического повреждения кожи на ушах кроликов. Морфологический анализ проводили на срезах толщиной 3-3,5 мкм, окрашенных гематоксилин-эозином и пикросирусом. Содержание коллагена определяли на основе аминокислотного анализа, гликозаминогликанов – по спектрофотометрической реакции с диметилметиленовым синим. Соотношение между незрелым и зрелым коллагеном оценивали по площади пиков на эндотермах денатурации коллагена, полученных методом дифференциальной сканирующей калориметрии.

Результаты. Толщина ткани кожи в области рубца была выше, чем в интактных участках. Образцы демонстрировали качественные признаки фиброза – толстые и продольные коллагеновые волокна, большое количество фибробластов, а также хроническое воспаление – в инфильтрате преобладали макрофаги и лимфоциты. По сравнению с интактной тканью доля коллагена в рубцах возрастом 1 месяц уменьшалась на 25%, а в рубцах возрастом 2-4 месяца оказалась повышенной на 15%. Доля гликозаминогликанов возрастала в рубцах возрастом 1 месяц в 2,5 раза, а в рубцах возрастом 2-4 месяца оказалась повышенной в 2,7 раза. В интактной коже сложная эндотерма денатурации состоит из низкотемпературного плеча ($61 \pm 1^\circ\text{C}$) связанного с денатурацией незрелого коллагена с неопределенными сшивками, основного пика ($66 \pm 1^\circ\text{C}$) и широкого пика денатурации гликированного коллагена ($70-90^\circ\text{C}$). В рубцах возраста 1 месяц к основному низкотемпературному пику примыкает плечо $66 \pm 1^\circ\text{C}$. Эндотерма двухмесячных рубцов состоит из двух примерно равных пиков 61°C и 66°C . Эндотермы рубцов 3-4 месяца аналогичны эндотермам интактной кожи.

Выводы. Созревание модельного рубца происходит за 3 месяца. Рубец относится к гипертрофическому типу.

Ф11. Современные анальгетики: обойдемся без морфина!

А.Н. Мурсалова (mursalova.anna7@mail.ru), Я.А.-А. Эль-Тарави

Кафедра биологической химии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Введение. Особенность патогенеза некоторых заболеваний ЦНС и зачастую их инкурабельность предполагает хронический прием пациентами соответствующего профиля опиоидных (наркотических) анальгетиков. При этом большинство из них обладает рядом побочных эффектов, заметно ухудшающих комфорт жизни пациентов. В связи с этим в медицине остро стоит вопрос поиска альтернативных опиоидным анальгетикам лекарственных средств, которые будут оказывать более выраженный терапевтический эффект с менее заметными побочными, что стало целью представленного исследования.

Материалы и методы. Анализ оригинальных и обзорных статей из баз данных Medline и Scopus за последние 10 лет.

Результаты. β -аррестины – недавно открытый вид белков, необходимых для трансдукции сигнала в эффекторных клетках. *Manglik et. al.* в 2016 в своем

исследовании, опубликованном в Nature, рассказали, что молекула PZM21 может стать ценной альтернативой, ведь при ее использовании в качестве μ -опиоидного агониста происходит формирование цепи реакций не по пути β -аррестина, а по пути, связанному с G-белком. Даже после фосфорилирования, активации и изменения конформации GPCR к рецептору не присоединяется β -аррестин, что в итоге приводит к анальгезии. При этом описано, что в результате данного каскада с участием одного из подтипов β -аррестина не проявляются многие побочные эффекты классических опиоидных анальгетиков.

Выводы. Возникнет или нет отрицательный эффект в виде угнетения дыхания, снижения перистальтики в желудочно-кишечном тракте, физической и психической зависимости и других эффектов зависит от подтипа β -аррестина, поэтому поиск новых методов воздействия на эти белки в скором времени может позволить избавиться от многих побочных эффектов опиоидных лекарственных средств.

Ф12. Выявление геномных прогностических маркеров неходжинских лимфом

С.С. Саенко¹ (saenko@phystech.edu), Д.А. Королева², С.В. Цыганкова¹, Е.С. Булыгина¹, А.В. Недолужко¹

¹НИИЦ Курчатовский Институт

²ФГБУ "НМИЦ гематологии" Минздрава России

Неходжинские лимфомы (НХЛ) представляют гетерогенную группу злокачественных опухолей лимфопролиферативной системы (в настоящее время правильнее говорить иммунной системы), которые отличаются друг от друга клиническими, морфологическими, иммунофенотипическими характеристиками, прогнозом развития заболевания и ответом на химиотерапию, являясь, по сути, разными типами злокачественных опухолей.

В связи с высоким разнообразием типов лимфом и из-за отличий в течение болезни, требуется скрупулезная диагностика и отличающиеся методы лечения. В настоящее время описаны лимфомы, не требующие оперативного вмешательства на протяжении долгих лет, другие же наоборот протекают с угрожающей скоростью.

Неходжинские лимфомы делят на несколько классов: агрессивные, вялотекущие и высоко-агрессивные. Современная диагностика НХЛ проводится на основании изучения морфологии части опухоли, полученной с помощью биопсии. В ходе этого анализа используются цитологические, гистологические и иммуногистохимические методы, которые, однако, не дают 100% точности. Поэтому разработка молекулярно-биологических и генетических маркеров и описание изменений молекулярных путей в тканях этого типа лимфом является важным направлением для диагностики и лечения НХЛ.

В рамках данного исследования 20 пациентам с ЛКМ из российской популяции было выполнено секвенирование экзонов (2-11) гена *TP53*. Впервые в России было проведен анализ взаимосвязи наличия мутации в гене *TP53* с ответом на терапию и неблагоприятным прогнозом ЛКМ. В 25% (5/20) случаев обнаружены мутации в гене *TP53* (5, 6, 7 экзоны). Методом FISH (флуоресценция in situ) у 3/5 пациентов с

мутацией в гене *TP53* была одновременно выявлена del17p (del+mut+), а у 2/5 была обнаружена только мутация (del-mut+). У одного пациента (1/20) была выявлена del17p, без наличия мутации в гене *TP53* (del+mut-). Таким образом, значимой корреляции между выявлением del17p и мутации в гене *TP53* получено не было. В отличие от наличия del17p, обнаружение мутации в гене *TP53* значимо ассоциировано с отсутствием ответа на терапию и быстрой прогрессией заболевания.

Список литературы.

1. Лорие Ю.Ю., Лимфома из клеток мантийной зоны: клинические формы, морфологические варианты, диагностика и лечение. Диссертация кандидата медицинских наук. 2009 год. E. Hoster *et al.*, *Blood*. **111**, 558–565 (2008).
2. H. Ye *et al.*, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 185 (2017).
3. C. W. Eskelund *et al.*, *Blood*. **130**, 1903–1910 (2017).

Ф13. Системы для активной направленной доставки противоопухолевых препаратов

А.Ю. Санач^{1,2} (anastapach@gmail.com), Т.В. Балабанова², А.М. Гилева², А.В. Яголович², О.О. Колоскова³, Е.А. Марквичева²

¹ ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (государственный университет)

² ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

³ ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России

Введение. Для того, чтобы свести к минимуму негативные побочные эффекты противоопухолевой терапии, могут использоваться специфичные наноносители - системы адресной доставки. Для их формирования используются молекулы-лиганды, способные специфически связываться только с целевыми опухолевыми клетками. Например, известно, что цитокин TRAIL способен вызывать гибель различных линий раковых клеток. Ранее был получен мутантный вариант TRAIL DR5-B, способный индуцировать апоптоз в опухолевых клетках более эффективно по сравнению с TRAIL дикого типа. Целью данной работы является создание новой липосомальной системы адресной доставки противоопухолевых препаратов, модифицированных модельным лигандом, способной впоследствии служить для доставки белка TRAIL DR5-B.

Материалы и методы. В качестве липидной основы для формирования липосом использовались катионные амфифилы на основе аминокислот и высших жирных спиртов. Для изучения возможности использования полученных липосом в качестве системы адресной доставки проводилась модификация их поверхности известным модельным лигандом - фолиевой кислотой. Предметом исследования являлась цитотоксичность полученных фолатных (ФА)-липосом, изученная методом МТТ-теста, а также эффективность их накопления в клетках, исследованная методами конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии *in vitro*. В работе использовались следующие клеточные линии: глиома головного мозга крысы (C6), рак шейки матки человека (HeLa), аденокарцинома молочной железы человека (MCF-7), мезенхимальные стволовые клетки человека (MSC) и глиома мозга человека (U-87MG).

Результаты. Было получено четыре типа ФА-липосом, загруженных модельным противоопухолевым препаратом доксорубицином (DOX), среди которых был вы-

бран наиболее эффективный (наибольшая эффективность данного образца была подтверждена МТТ-тестом на клетках HeLa) и изучены его физико-химические свойства. Так, средний диаметр выбранных ФА-липосом - 135 нм, а ζ -потенциал +51 мВ. Было показано, что в клетках MCF-7 и C6 эффективность накопления и цитотоксичность ФА-липосом существенно выше, по сравнению с обычными липосомами (без лигандов). При этом в клетках MSC и U-87MG эффективность накопления и токсичность обычных и ФА-липосом практически не различалась.

Выводы. Были получены катионные липосомы, модифицированные модельным лигандом (остатком фолиевой кислоты) и изучены их физико-химические свойства. Показано, что предложенная система способна эффективно доставлять препарат в различные типы раковых клеток (HeLa, MSC, MCF-7, C6, U-87MG) и вызывать их гибель в течение 24-48 ч. Таким образом, сформированные катионные липосомы будут использованы для формирования системы адресной доставки, модифицированной мутантным белком TRAIL DR5-B.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты 18-34-00919, 18-34-00812).

Ф14. Роль трансмембранных белков семейства Notch в патогенезе воспаления при хронической обструктивной болезни легких

В.В. Ульянов (bob4er@mail.ru)

Кафедра фармакологии Сибирского государственного медицинского университета

Введение. Notch – сигнальный каскад – эволюционно древняя система, с помощью которой клетки контактируют со своим микроокружением через непосредственное взаимодействие друг с другом. Она регулирует нормальное эмбриональное развитие и гомеостаз тканей во взрослом организме. Существуют доказательства того, что Notch – система играет важную роль в развитии и гомеостазе легких. Notch рецепторы и лиганды широко экспрессируются на клетках легких. Имеются экспериментальные данные, что при каких-либо нарушениях функционирования данного каскада, нарушится нормальный легочный гомеостаз, что приводит к развитию заболеваний, таких как ХОБЛ, одним из главных морфофункциональных проявлений которой является эмфизема.

Материалы и методы. Исследования проводились на мышах самках линии C57BL/6. Эмфизему индуцировали тремя способами - путем однократного интратрахеального введения эластазы (1), однократным интратрахеальным введением липополисахарида и экстракта сигаретного дыма (ЭСД) (2) и интраперитонеальным введением D-галактозамина (3). Для подтверждения формирования модели проводилось гистологическое исследование ткани легких. Методами проточной цитофлуориметрии на 14-е (эластазная модель), 16-е сутки (модель, индуцированная ЭСД) и 3-и сутки (галактозаминовая модель) изучали количество эндотелиальных клеток (CD45⁺ CD309⁺). Их количество выражали в процентах от общего количества окрашенных мононуклеаров. Среди эндотелиальных клеток оценивали процент клеток, экспрессирующих внутриклеточный маркер Notch1.

Результаты. В условиях эластазо-индуцированной модели эмфиземы легких количество эндотелиальных клеток достоверно уменьшалось, количество клеток,

экспрессирующих Notch1, увеличивалось к 16-м суткам эксперимента. В условиях модели эмфиземы, индуцированной ЭСД, количество эндотелиальных клеток не изменялось, субпопуляция клеток, экспрессирующих Notch 1, имела недостоверную тенденцию к росту. В условиях галактозаминовой модели эмфиземы содержание эндотелиальных клеток увеличивалось, количество клеток, экспрессирующих маркер Notch1, не изменялось.

Выводы. Notch – система препятствует развитию ХОБЛ, являясь защитным фактором, способствующим активации ангиогенеза через Notch1 рецепторы на эндотелиоцитах.

Ф15. Влияние различных вариантов алкогольной интоксикации на метаболизм дофаминергической системы в гипоталамусе крыс

М.А. Хлебин (arahnidas@mail.ru)

Кафедра биохимии УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Введение. Дофаминергическая система головного мозга занимает одну из ведущих позиций в регуляции нейроморальных и когнитивных процессов ЦНС, а также нервно-психической деятельности человека. Длительный, систематический приём алкоголя сопровождается нейropsychическими нарушениями, дисфункцией ряда физиологических процессов ЦНС, а также формированием синдрома зависимости, в основе которых лежит изменение статуса дофаминергической системы под действием этанола.

Материалы и методы. В эксперименте было использовано 32 беспородных белых крыс-самцов массой 180-220 г. Хронической алкогольную интоксикацию (ХАИ) и прерывистую алкогольную интоксикацию (ПАИ-4 и ПАИ-1) моделировали путем внутрижелудочного введения 25%-го раствора этанола в дозе 3,5 г/кг массы тела дважды в день в течение 28 суток. Животные контрольной группы получали эквивалентное количество воды. Содержание свободных аминокислот и биогенных аминов определяли методом ВЭЖХ.

Результаты. При ХАИ в гипоталамусе достоверно повышались концентрации тирозина, дофамина и норадреналина в сравнении с контрольной группой. В группе ПАИ-4 было выявлено достоверное увеличение уровней тирозина и дофамина. ПАИ-1 сопровождалось увеличением концентрации тирозина по отношению к контрольным показателям и относительно группы ПАИ-4. Помимо этого, при данной форме алкогольной интоксикации повышались концентрации метаболитов дофамина – гомованилиновой кислоты и норадреналина в сравнении с контролем и группой ПАИ-4.

Выводы. Хроническая и прерывистая алкогольная интоксикация вызывали однонаправленные, но различные по выраженности отклонения различных биохимических показателей дофаминергической системы в гипоталамусе головного мозга крыс. Наблюдалось выраженный рост концентрации тирозина во всех исследованных группах, а также увеличение содержания дофамина при ХАИ и ПАИ-4 и норадреналина при ХАИ и ПАИ-1.

Ф16. Иммунологические сдвиги у детей, страдающих расстройствами аутистического спектра

*Н.В. Шаронова (naatnatalie@gmail.com), Ю.М. Чудакова, С.А. Канонирова, Г.В. Шмарина, Е.С. Ершова, С.В. Костюк
Лаборатория молекулярной биологии, ФГБНУ «МГНЦ»*

Введение. Заболевания, входящие в группу расстройств аутистического спектра (РАС), характеризуются нарушениями коммуникативной, когнитивной и речевой сфер и навязчивым стереотипным поведением. Особенностью пациентов, страдающих РАС, является аберрантная воспалительная реакция, связанным с дисфункцией иммунной системы. Цель работы: выявить признаки системного воспалительного процесса у пациентов с РАС.

Материалы и методы. В клиническую группу вошли 133 ребенка с расстройствами аутистического спектра (F 84.02, 84.11 по МКБ-10) в возрасте от 4 до 10 лет. Контрольная группа была сформирована из 24 здоровых детей того же возраста. Исследовали концентрацию цитокинов (IL-1 β , IL-8, IL-17A, IL-10) в плазме крови, а также экспрессию генов *NFKB1*, *ИЛ-8*, *ИЛ-1 β* мононуклеарными клетками (МНК) пациентов с РАС и здоровых детей. Уровень цитокинов в крови измеряли с помощью коммерческих иммуноферментных наборов (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург). МНК периферической крови выделяли в градиенте плотности фиколл-урографин. Для выделения РНК использовали RNeasy Plus Mini Kit (“Qiagen” Германия). Реакцию обратной транскрипции осуществляли по стандартной методике с использованием реактивов фирмы «Силекс» (Россия). Уровень экспрессии генов *NFKB1*, *ИЛ-8*, *ИЛ-1 β* оценивали методом ПЦР в реальном времени. Данное исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ».

Результаты. Концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-8, и IL-17A в плазме пациентов с РАС были статистически значимо выше, чем у здоровых детей. В то же время концентрация противовоспалительного цитокина IL-10 у пациентов с РАС была существенно ниже соответствующего показателя в контрольной группе. Результаты оценки уровня экспрессии генов транскрипционного фактора *NFKB1* и провоспалительных цитокинов *ИЛ-1 β* и *ИЛ-8* в МНК периферической крови полностью соответствовали данным о концентрации цитокинов в плазме: в группе пациентов с РАС уровень экспрессии *NFKB1* был в 2 раза выше, а уровни экспрессии *ИЛ-1 β* и *ИЛ-8* были, соответственно, в 2 и 3 раза выше, чем в клетках здоровых детей.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о наличии у детей с РАС системной реакции воспаления.

Работа поддержана грантом РФФИ №17-04-01587А.

Ф17. Изучение физиологической роли митохондриального пептида L116 на модели нокаутных мышей

М.А. Шепелюк (*mshep98@mail.ru*)

Кафедра физиологии человека и животных биологического факультета, МГУ имени М.В. Ломоносова

Введение. Небольшие пептиды, играя значимую роль в клетке, составляют плохо изученный класс биомолекул, из-за ошибок при анализе кодирующих их коротких генов (многие из них были ошибочно аннотированы как гены некодирующих РНК). В работе исследуется функция пептида L116, закодированного в гене 1500011k16Rik мыши. Экспрессия гена была доказана на модели клеточных линий. Было показано, что L116 локализован в митохондриях, где, посредством взаимодействия с цитохром-*b5* редуктазой 3, косвенно влияет на активность комплекса I дыхательной цепи. Инактивация гена L116 отрицательно сказывается на активности комплекса I, что приводит к нарушению липидного обмена. В данной работе впервые исследовали фенотипические последствия выключения гена 1500011k16Rik в поведении, выносливости, мышечной силе мышей, их энергетическом метаболизме.

Материалы и методы. В работе использовали 13 самцов мышей, нокаутных по гену 1500011k16Rik, и 10 особей дикого типа, используемых в качестве контрольной группы. Тестирование поведения осуществляли в тестах «Силомер» и «Вынужденное плавание с грузом», оценку дыхательного коэффициента (RER) на холоде (+4°C) производили в метаболических камерах, клинический и биохимический анализ крови - на образцах крови, отобранной из сердца.

Результаты. В проведенных тестах были выявлены статистически значимые отличия между группами: нокауты отказались выносливее мышей дикого типа в тесте «Вынужденное плавание с грузом», но слабее в тесте «Силомер»; уровень глюкозы, лактата, триглицеридов, холестерина и RER был выше у нокаутов, что, вероятно, отражает предпочтительное использование углеводов, а не липидов в качестве субстрата для дыхания.

Выводы. Показано влияние пептида L116 на характер мышечного ответа мышей на стрессор, на дыхательную активность митохондрий (повышение дыхательного коэффициента), а также на биохимические показатели (роль в липидном обмене и в регуляции анаэробного и аэробного метаболизма).

Ф18. Роль уреазы *Helicobacter pylori* в патогенезе эрозии желудка, гастрита и язвы

Я.А.-А. Эль-Тарави (*yasmin.el-taravi@bk.ru*), А.Н. Мурсалова

Кафедра биологической химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Введение. *Helicobacter pylori* является одним из главных и наиболее распространенных этиологических факторов гастрита, язвенной болезни, «функциональной» диспепсии. Современные данные также рассматривают *H. pylori* в качестве канцерогена, способствующему развитию аденокарцином и лимфом желудка. Однако многие механизмы действия *H. pylori* до сих пор остаются малоизученными, что побуждают ученых к более детальному исследованию жизнедеятельности *H. pylori* в условиях организма хозяина.

Цель исследования. Изучить доменное строение уреазы *H. pylori* и её место в патогенезе гастрита, язвы и эрозии желудка.

Материалы и методы. Анализ научной литературы из баз данных Scopus и Medline за последние 20 лет.

Результаты. Были детально изучены строение уреазы *H. pylori*, особенности её формирования. Уделено особое внимание функциям каждого из доменов UreH, UreE, UreF и UreG уреазы, а также особенностям формирования активного центра фермента. Отмечено, что наличие полости в центре уреазы способствует персистенции бактерии в просвете ЖКТ человека. Достоверно установлено, что уреазы *H. pylori* снижает pH желудка, также способствуя персистенции этой бактерии. Также обращено внимание на особенности колонизации *H. pylori*, и механизмы уклонения спиралевидной бактерии от распознавания иммунной системой, в частности, индукция противовоспалительного ответа в результате каскадов реакций. Описан принцип действия уреазного дыхательного теста как достоверной неинвазивной методики диагностирования хеликобактериозов.

Выводы. Сегодня технологии позволяют нам детально изучить строение уреазы *H. pylori* и особенности и формирования. Учитывая рост числа публикаций по терапии хеликобактериозов, основанных на блокаде функций уреазы, можно с уверенностью сказать, что изучение этого фермента становится вектором развития для специалистов в этой области.

Ф19. Новый конъюгат лиганда ASGP-R с паклитакселом – перспективное pH-чувствительное пролекарство

Д.А. Гришин¹ (dmitry_grishin.letter@inbox.ru), Р.А. Петров¹, И.М. Ле-Дейген², Е.Э. Ондар¹, Е.К. Белоглазкина¹, А.Г. Мажуга¹, Н.В. Зык¹

¹Лаборатория биологически активных органических соединений, Кафедра органической химии

²Лаборатория химического дизайна бионаноматериалов, Кафедра химической энзимологии, Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

Гепатоцеллюлярная карцинома – одна из самых распространённых злокачественных опухолей человека. Для повышения эффективности химиотерапии на данный момент в литературе рассматривается метод адресной доставки. Разумной мишенью для адресной доставки в гепатоциты является асиалогликопротеиновый рецептор (ASGP-R), распознающий производные галактозы и N-ацетилгалактозамина. Экспрессия ASGP-R в гепатоцитах намного превышает экспрессию в других клетках тела. Высокая экспрессия в гепатоцитах (500 000 ASGP-R на один гепатоцит) и минимальная экспрессия в других клетках организма позволяют использовать ASGP-R для минимально токсичной целевой доставки лекарственных средств. Для терапии гепатоцеллюлярной карциномы часто используют паклитаксел, однако он характеризуется малой растворимостью в воде и низкой биодоступностью (5,6%). Для решения данных проблем перспективным представляется подход синтеза стимул-чувствительных пролекарств паклитаксела. Известно, что во многих опухолевых тканях, ввиду нарушения метаболизма, происходят воспалительные процессы, сопровождающиеся понижением pH межклеточной жидкости.

Таким образом, целесообразно синтезировать пролекарства, в которых активная часть связана с биосовместимым фрагментом через pH-чувствительный лин-

кер. Целью настоящей работы является синтез pH-чувствительного пролекарства паклитаксела, в котором активную часть с адресной меткой - углеводным фрагментом, связывает -S-S- линкер.

Нами была предложена следующая структура конъюгата лигандов ASGP-R с паклитакселом, контролируемо высвобождающимся внутри клетки за счёт гидролиза кислот-чувствительного линкера.

Для синтеза конъюгатов использовали коммерчески доступные реагенты. Структуру полученных соединений доказывали при помощи методов ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 17-74-30012.

Авторы выражают благодарность Э.Ю. Ямансарову за оказанное содействие в синтезе.

Ф20. Сравнительная транскриптомика тканей головного мозга и цельной крови при болезни Паркинсона

Д.А. Каширских (dim.kashirskih@gmail.com)

Кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, ФГБОУ ВО «ВГУ»

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по важности нейродегенеративным расстройством после болезни Альцгеймера. Мета-анализ всемирных данных указывает на рост распространенности БП с возрастом (107 на 100,000 человек в группе 50–59 лет и 1903 на 100,000 после 80). Хотя первичные причины болезни Паркинсона и их патогенные механизмы до сих пор не ясны, сравнение транскриптомов дает новые знания о комплексных процессах нейродегенерации.

Материалы и методы. Проанализирована комбинация 213 генетических профилей ($n_{\text{опыт}} = 124$; $n_{\text{контроль}} = 89$) для идентификации дифференциально регулируемых генетических путей, которые дисрегулируются в клетках цельной крови человека ($n_{\text{опыт}} = 50$; $n_{\text{контроль}} = 23$) и тканях головного мозга ($n_{\text{опыт}} = 74$; $n_{\text{контроль}} = 66$) у пациентов с болезнью Паркинсона, по сравнению с контрольными группами. Статистический анализ был осуществлен при помощи эмпирического метода Байеса.

Результаты. Гены участвующие в патогенезе болезни Паркинсона были идентифицированы анализом дифференциальной экспрессии в соответствии с результатами отдельных исследований, которые сгенерировали используемые наборы данных. В отличие от отдельных исследований, анализ дифференциальной экспрессии и дальнейший анализ пути достоверно выявили ($P < 0,02$) изменение уровней мРНК путей металлопротеинов, связывающих металлы, ответа на ионы металлов, клеточных ответов на внешние стимулы и MAPK6/MAPK4 сигнализации у пациентов с БП по сравнению со здоровым контролем.

Выводы. Обнаружение надежных маркеров крайне необходимо для разработки методов ранней диагностики, мониторинга и лечения. Была показана достоверная корреляция между профилями экспрессии болезни Паркинсона и нарушением регуляции путей клеточного ответа и сигнализации. Отдельные гены путей могут быть использованы в качестве биомаркеров нейродегенерации.

Содержание

Программа форума.....	3
Схема здания биологического факультета	4
Секция «Доклады»	5
Д1. Изучение адаптивного иммунитета <i>Asteria rubens</i> при стимуляции <i>Escherichia coli</i> и <i>Bacillus subtilis</i>	5
Д2. Выявление мутаций в генах BRCA1/2, ассоциированных с повышенным риском развития рака молочной железы, у пациентов Центрально-Черноземного региона РФ	5
Д3. Функциональная роль полиморфных вариантов ДНК-гликозилазы NEIL2 человека в репарации ДНК	6
Д4. Возможная роль гомологов С-домена ОСР в регуляции механизма фотозащиты цианобактерий	7
Д5. Генетически кодируемый pH-сенсор на основе желтого флуоресцентного белка из <i>Phialidium sp.</i>	8
Д6. Новая термофильная бактерия, восстанавливающая антрахинон-дисульфонат.....	9
Секция «Биохимия»	10
Б1. Продукция мембранных белков в активном состоянии в бесклеточной системе: поиск новых мембраноподобных сред	10
Б2. Получение рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы человека (L-NEP) в составе гибридной конструкции	11
Б3. Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i> как модель для поиска митохондриальных разобщителей с максимальным диапазоном нетоксичных эффективных концентраций.....	11
Б4. Исследование процесса переноса протона в ходе фотоцикла бактериородопсина.....	12
Б5. Роль нового трансмембранного модулятора пуринергического рецептора P2Y1 и рецепторов факторов роста фибробластов – c-Ansger в регенерации и развитии мозга у холоднокровных	13
Б6. Регуляция пиридоксалькиназы человека тиаминтрифосфатом.....	14
Б7. Исследование белка p61-59 бактериофага 24В	15
Б8. Липоксигеназы микроорганизмов: распространение и функции.....	16
Б9. Стереоселективный синтез производного бромтриптофана для твердофазного пептидного синтеза	17
Б10. Эндогенный формальдегид человека как противоопухолевый метаболит: методы количественной оценки его содержания в раковой опухоли.....	17
Б11. Интерлейкин-4 предотвращает развитие инсулинорезистентности и активирует STAT6 и Akt-зависимые сигнальные пути в адипоцитах 3T3-L1	18
Б12. Моделирование гидролиза субстрата Dabcyl-KQ ₃ GD-EDANS субъединицами 20S протеасомы	19
Б13. Получение быстрой скелетной изоформы тропонина I и ее идентификация в скелетных мышцах	20
Б14. Изучение структурного взаимодействия между нейротрофиновым рецептором p75 и фактором TRAF6.....	21
Б15. Исследование свойств трифенилфосфониевых аналогов хлорамфеникола	22
Б16. Получение рекомбинантного растворимого домена неприлизина человека в эукариотической экспрессионной системе Expi293F и исследование расщепления под его действием различных форм натрийуретического пептида типа В человека	23
Б17. Изучение биохимических свойств сывороточного амилоида А человека.....	24
Б18. Разработка методов выделения эндогенных гликопротеинов, ассоциированных с беременностью (PAGs)	24

B19. Изучение ингибирующего действия новых анионных производных фуллерена C ₆₀ на активность интегразы ВИЧ-1	25
B20. Влияние окисления и гликирования на взаимодействие ГАФД с РНК: компьютерное моделирование и эксперименты <i>in vitro</i>	26
B21. Влияние содержания азота на уровень экспрессии гена салицилатгидроксилазы штамма рода <i>Pseudomonas</i>	27
B22. Получение рекомбинантных гликопротеинов, ассоциированных с беременностью парнокопытных, и сравнение некоторых их свойств с эндогенными белками	28
B23. Секретируемые флуоресцентные белки для изучения динамичной локализации фитаспазы.....	29
B24. Стерические взаимодействия антибиотиков цефалоспоринового ряда с металло-β-лактамазой	30
B25. Tat белок вируса иммунодефицита человека (HIV-1): детекция трансактивационной активности и влияние на внутриклеточные процессы.....	31
B26. Исследование регуляции глутаматдегидрогеназы животных путем ацилирования...32	
B27. Пептидогликангидролазы колифагов RB43, RB49 и T5: их субстратная и бактериоспецифичность	33
B28. Изучение эффекта различных координационных комплексов Cu с азот-содержащими лигандами на пептидазную активность протеасомы.....	34
B29. Влияние pH среды на времена жизни флуоресценции сенсорного белка SynHer3s...35	
Секция «Молекулярная и клеточная биология».....	36
M1. Разработка метода полногеномного анализа инсерций ретротранспозонов L1 с помощью мишень-направленного массивного параллельного секвенирования	36
M2. Изучение роли факторов, действующих через вторичный канал РНК-полимеразы, в сопряжении транскрипции и репарации ДНК.....	37
M3. Т-кадгерин как ранее неизвестный рецептор липопротеидов низкой плотности на тромбоцитах.....	38
M4. Исследование взаимодействия антител GFAP81 и GFAP83 с нативным и рекомбинантным глиальным фибриллярным кислым белком	39
M5. Динамика изменения активности, а также экспрессии каталитических субъединиц протеасом в условиях адаптации эукариотической клетки к тепловому шоку.....	40
M6. Получение первичной культуры кардиомиоцитов крысы и идентификация в ней сердечной изоформы тропонина Т	41
M7. Необычная организация 18S рРНК у представителя полухордовых.....	42
M8. Разработка активаторов/репрессоров экспрессии генов в клетках млекопитающих на основе CRISPR-Cas9 системы редактирования генома.....	43
M9. Новые подходы к анализу пространственной организации генома	44
M10. Участие сигнала ядерной локализации бактериальных патогенов в индукции синтеза гамма-тионина.....	45
M11. Мутации в различных доменах ламина А изменяют механические свойства ядра ..46	
M12. Определение структуры CRISPR кассет методами высокоэффективного секвенирования	47
M13. Роль длинной некодирующей РНК гоХ в поддержании структуры комплекса дозовой компенсации <i>Drosophila melanogaster</i>	48
M14. Влияние дисфункции когезина на структурную организацию хроматина.....	48
M15. Влияние 3D-конструкций из поли-3-оксибутирата на активацию дифференцировки МСК в остеогенном направлении.....	49
M16. Серотонин повышает чувствительность мезенхимных стромальных клеток к норадреналину	50
M17. Характеристики NG2 как клеточного маркера перестроек гена <i>KMT2A</i>	51
M18. Взаимосвязь eIF4G2 и PCBP2 в регуляции трансляции друг друга	52

M19. Изучение трансляционных событий на стоп-кодонах репортёрных мРНК в бесклеточной системе	53
M20. Ингибирование пролиферации HER2/неc-позитивных клеток моноклональными антителами сопровождается снижением экспрессии генов альдегиддегидрогеназ	54
M21 Роль ядерной ламины при миграции клеток: связь со старением и опухолевой прогрессией.....	55
Секция «Физиология и медицинская биохимия»	56
Ф1. Долговременные эффекты регуляторов дегидрогеназ 2-оксокислот на метаболизм коры головного мозга крыс в норме и после спинномозговой травмы	56
Ф2. Особенности влияния амитриптилина на внутриклеточные кальциевые ответы в кортикальных нейронах	57
Ф3. Влияние диеты с повышенным содержанием глюкозы на IgA-опосредованный иммунный ответ у мышей	58
Ф4. Оценка цитохром P450 3A4-зависимых межлекарственных взаимодействий противоопухолевого препарата абиратерона и макролидного антибиотика эритромицина	58
Ф5. Эндокринные нарушения у крыс при морфиновой интоксикации	59
Ф6. В мозге взрослых крыс, подвергшихся пренатальной гипоксии, повышен уровень триптофана и ослаблены гомеостатические механизмы.....	60
Ф7. Экспрессия гена рецептора орексина первого типа (Ox1R) в период абстиненции у алкоголизованных крыс	61
Ф8. Динамика количества рецепторов дофамина 1 в лимфоцитах периферической крови на фоне антипсихотической терапии	62
Ф9. Влияние фрагментов окисленной вкДНК на активность генов провоспалительных цитокинов в мононуклеарах периферической крови детей, страдающих расстройствами аутистического спектра.....	63
Ф10. Формирование модельного рубца: физико-химический анализ	63
Ф11. Современные анальгетики: обойдемся без морфина!	64
Ф12. Выявление геномных прогностических маркеров неходжкинских лимфом	65
Ф13. Системы для активной направленной доставки противоопухолевых препаратов	66
Ф14. Роль трансмембранных белков семейства Notch в патогенезе воспаления при хронической обструктивной болезни легких	67
Ф15. Влияние различных вариантов алкогольной интоксикации на метаболизм дофаминергической системы в гипоталамусе крыс	68
Ф16. Иммунологические сдвиги у детей, страдающих расстройствами аутистического спектра.....	69
Ф17. Изучение физиологической роли митохондриального пептида L116 на модели нокаутных мышей.....	70
Ф18. Роль уреазы <i>Helicobacter pylori</i> в патогенезе эрозии желудка, гастрита и язвы	70
Ф19. Новый конъюгат лиганда ASGP-R с паклитакселом – перспективное рН-чувствительное пролекарство	71
Ф20. Сравнительная транскриптомика тканей головного мозга и цельной крови при болезни Паркинсона.....	72

Научное издание

I межвузовская студенческая конференция
СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2018

17 декабря 2018 г.

Материалы конференции

Составление и верстка: Е.П. Альтшулер
Дизайн обложки: В.К. Киреева

Формат 90х60/16
Печать цифровая
Усл. печ. листов 4,75
Тираж 140 экз.
Шрифт PT Serif
Изд. Биологический факультет МГУ
Заказ 10
Подп. в печать 14.12.2018