ВТОРОЙ СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ

09–10 февраля
2020 года. Москва

материалы
конференции

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

Кафедра биохимии

II межвузовская студенческая конференция

СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2020

09-10 февраля 2020 г.

Материалы конференции

Москва – 2020

УДК 577
ББК 28.07

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

Оргкомитет конференции

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

СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2020: II межвузовская студенческая конференция: 09-10 февраля 2020 г., Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет: Материалы конференции / Отв. ред. А.Г. Катруха. Сост. В.М. Шатов. - М.: Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, 2020. - 76 с.

ISBN 978-5-9500298-8-2

УДК 577
ББК 28.07
ISBN 978-5-9500298-8-2

Биомолекула

9 ФЕВРАЛЯ
воскресенье

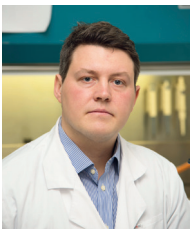
9:00–10:00
Регистрация и утренний кофе
(рекреация перед аудиторией М1), размещение постеров

10:00–10:10
Открытие форума (аудитория М1)

10:10–11:00
Пленарная лекция (аудитория М1)
С.А. Лукьянов, д.б.н, профессор, ректор
(РНИМУ имени Н.И. Пирогова, Россия, Москва).
Биомедицина — что день грядущий
нам готовит?

Секция «Биохимия»
(Аудитория М1, председатель — д.б.н., профессор **Н.Б. Гусев**)

11:00–11:40
к.б.н. **А.Г. Семенов** (Hytest, Москва, Россия).
Натрийуретические пептиды:
от фундаментальных биохимических
исследований к повседневной практике
в клинической медицине



11:40–11:55

Д.Ю.Басс [1,2], Е.С.Потехина [2]

Дегидрогеназа D-аминокислот из *Pseudomonas aeruginosa* как инструмент для изменения внутриклеточной концентрации пирувата

[1] МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет;
[2] ИБХ имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва.

11:55–12:10

А.С. Кузнецов [1,2], Е.Е. Куликов [2,3], К.М. Бойко [4], П.А. Иванов [2], А.К. Голомидова [2], А.Д. Ефимов [2], А.В. Летаров [1,2]

Особенности stx-конвертирующего бактериофага φ24B

[1] МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет;
[2] Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва;
[3] МФТИ; [4] Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва.

12:10–12:40

Перерыв (кофе; рекреация перед аудиторией М1)

Секция «Молекулярная и клеточная биология»

(Аудитория М1, председатель — д.б.н., профессор **В.В. Белоусов**)

12:40–13:20

к.б.н., в.н.с **С.В. Ульянов** [1,2]

Трехмерная геномика

[1] МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет;
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Россия, Москва.

13:20–13:35

М.Д. Магнитов [1,2], С.В. Ульянов [1,3], А.К. Величко [1], А.В. Лужин [1], А.В. Тяхт [1], О.Л. Кантидзе [1]

Роль жидко-жидкостного разделения фаз в установлении и поддержании трёхмерной структуры хроматина

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук; [2] МФТИ; [3] МГУ имени М. В. Ломоносова, Биологический факультет.

13:35–13:50

В.В. Крюкова [1], Н.Н. Логунова [2], П.В. Шелякин [3], Е.С. Егоров [3], Е.М. Мерзляк [3], Д.М. Чудаков [1,3], О.В. Британова [3]

Формирование наивных репертуаров CD4+ конвенциональных и регуляторных Т-клеток в условиях селекции на полиморфных вариантах MHC-II

[1] Сколковский институт науки и технологий, Россия, Москва;
[2] Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Россия, Москва;
[3] ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Россия, Москва.

13:50–14:50

Обед (столовая «Биосфера», первый этаж, возле главного входа)

Секция «Физиология и медицинская биохимия»

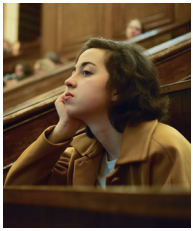
(Аудитория М1, председатель — д.б.н, профессор **О.С. Тарасова**)

14:50–15:30

к.б.н., в.н.с **Д.В. Попов**
(Институт медико-биологических проблем РАН, Россия, Москва)

Особенности энергетического обеспечения скелетных мышц и их роль в регуляции метаболизма в организме человека

15:30-15:45



Якупова А.Г. [1], Бондарева М.А. [2], Гривенников С.И. [3], Круглов А.А. [2,4]

Оценка терапевтического действия IgA антител в мышиной модели колоректального рака

[1] МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет;
[2] НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова;
[3] Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, United States;
[4] German Rheumatism Research Center (DRFZ), a Leibniz Institute, Berlin, Germany.

15:45-16:00

А.С. Таран [1], О.А. Зубкова [2], А.Е. Харитонов [2], М.А. Лагарькова [2], И.Б. Алиева [3]

Мутация в гене HTT влияет на уровень экспрессии цитоскелетных белков, организацию цитоскелета и подвижность культивируемых кожных фибробластов пациентов с болезнью Гентингтона

[1] МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет биоинформатики и биоинженерии; [2] Федеральный научный клинический центр физико-химической медицины федерального медико-биологического агентства, Москва; [3] НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ им. Ломоносова, Москва.

16:00-16:30

Перерыв (кофе; рекреация перед аудиторией М1)

Секция «Биоинженерия и Биотехнология»

(Аудитория М1, председатель — д.б.н., профессор **А.Г. Катруха**)

16:30-17:10

к.б.н., м.н.с **М.А. Носенко** (Институт молекулярной биологии РАН, Россия, Москва)

Биоматериалы в тканевой инженерии и регенеративной медицине

17:10–17:25

Д.Д. Смолярова [1,2], В.В. Пак [2], В.В. Белоусов [2]

Флуорогенный биосенсор для детекции пероксида водорода

[1] *МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва;*
[2] *ФГБУ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва.*

18:00–21:30

Культурная программа

10 ФЕВРАЛЯ

понедельник

10:00–11:30

Постерная сессия

все секции (просмотр постеров участниками других секций) (рекреации перед аудиториями ББА и М1)

11:30–12:00

Перерыв (кофе; рекреация перед аудиторией М1)

12:00–15:00

Постерная сессия

все секции (время обязательного присутствия у постера, беседа с жюри) (рекреации перед аудиториями ББА и М1)

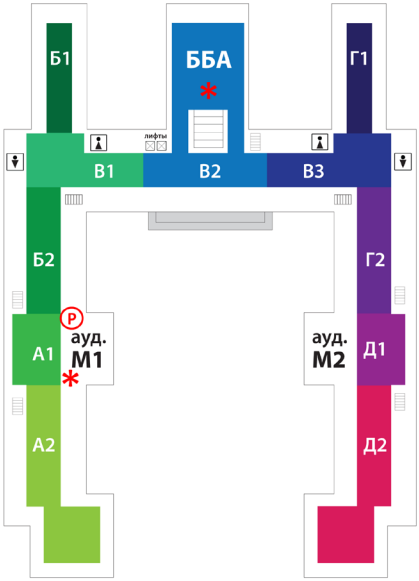
15:30–16:30

Закрытие форума

вручение призов победителям форума (аудитория ББА)

Схема здания биологического факультета

этаж / сектор	2	3	4	5
А2	204-224 201-219	301-307 302-324	401-417 402-420	501-517 502-514
А1	М-1 220, 222а	317а-317б	4-4а	5-5а
Б2	221-227 226-234	319-329 326-338	419-431 422-440	519-535 516-530
Б1	229-239 236-250	331-343 340-360	433-445 442-458а	537-545 532-546
В1	241-245 230, 254-256	345-355 362а-370	449-459 460-464	547-555 548-552
В2	ББА 258	357-363	461-463 466-468	557-559г 500, 556
В3	247-255 260-266	365-375 372-380	497-499г 494-498ж	559а-571б 558-566
Г1	257-271 268-280	377-389 382-392	487-495 482-492	579-587 568-580
Г2	273-285 282-294	391-399 394-398	497-499г 494-498ж	582-594 589-599б
Д1	М-2	399е-399д		5д
Д2	287-299 296-298	399ж-399п 398а-398с	499е-499р 498и-498д	599в-599м 598-598н



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

Обозначения:

Р
- место регистрации (2 этаж, рекреация перед ауд. М1)

*
- доклады и открытие форума (ауд. М1)
- секция «Биохимия» и «Физиология и медицинская биохимия» в рекреации перед ауд. М1 (2 этаж)
- секции «Молекулярная и клеточная биология» и «Биоинженерия и Биотехнология» в рекреации перед ББА (2 этаж)
- обеденный перерыв в столовой «Биосфера» (1 этаж, возле главного входа)
- закрытие форума в ауд. ББА (2 этаж)

+7 916 173-47-10 Серебряная Дарья Владимировна

+7 905 511-77-13 Шатов Владислав Михайлович

+7 985 923-22-48 Катруха Алексей Генрихович

Секция «Доклады»

Д1. Дегидрогеназа D-аминокислот из *Pseudomonas aeruginosa* как инструмент для изменения внутриклеточной концентрации пирувата

Д.Ю. Басс (bass.dina2014@yandex.ru)[1,2], Е.С. Потехина[2]

[1]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

[2]Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Россия, Москва

Введение. Нарушения транспорта пирувата в митохондрии и его окисления наблюдаются при многих типах рака. Искусственная стимуляция окислительного метаболизма замедляет рост опухолей [1,2]. Чтобы оценить влияние внутримитохондриальной концентрации пирувата на раковые клетки, мы разрабатываем инструмент для её регуляции на основе дегидрогеназы D-аминокислот (dadA) из *Pseudomonas aeruginosa*. Этот FAD-зависимый фермент окисляет D-аланин до пирувата и аммиака [3]. Поскольку D-аланин практически отсутствует в клетках млекопитающих, активность dadA контролируется добавлением субстрата извне.

Материалы и методы. Для повышения растворимости dadA и наблюдения за её локализацией и состоянием *in vivo* получали химерные конструкции из dadA и флуоресцентных белков mRuby и EGFP с сигналом митохондриальной локализации tdmito. Для создания неактивного контрольного варианта dadA консервативные аминокислотные остатки Tyr17 и Tyr18, предположительно связывающие FAD, заменяли на остатки аланина. Активность мутантного и химерных белков оценивали по опубликованному протоколу [3]. Влияние активности tdmito-EGFP-dadA на мембранный потенциал митохондрий клеток HeLa Kyoto оценивали методом флуоресцентной микроскопии с индикатором потенциала метиловым эфиром тетраметилродамина (TMRM). Уровень генерации H2O2 в митохондриях активной tdmito-mRuby-dadA оценивали с помощью флуоресцентного сенсора на H2O2 HyPer 3 mito.

Результаты. Мутант Tyr17Ala-Tyr18Ala утратил ферментативную активность. Химерные конструкции mRuby-dadA и EGFP-dadA имели ту же активность, что фермент дикого типа. При экспрессии в клетках HeLa Kyoto химерные белки, в отличие от dadA дикого типа, не образовывали агрегатов и локализовались в митохондриях. При добавлении к клеткам, экспрессирующим tdmito-EGFP-dadA, раствора D-аланина, флуоресценция TMRM возрастала по сравнению с исходным значением и с контролем. Увеличение концентрации H2O2 не наблюдалось ни в клетках, экспрессирующих tdmito-mRuby-dadA, ни в контроле.

Выводы. Активность dadA приводит к увеличению мембранного потенциала митохондрий. При этом электроны с кофактора FAD не участвуют в генерации активных форм кислорода.

Список литературы.

1. L. R. Gray, S. C. Tompkins, E. B. Taylor. Cell. Mol. Life Sci. (2013).
2. J. C. Schell et al. Mol. Cell. 56, 1–14 (2014).
3. W. He, C. Li, C. Lu. J. Bacteriol. 193, 9, 2107–2115 (2011).

Д2. Формирование наивных репертуаров CD4+ конвенциональных и регуляторных Т-клеток в условиях селекции на полиморфных вариантах MHC-II

В.В. Крюкова (lekryukova@gmail.com)[1], Н.Н. Логунова[2], П. В. Шелякин[3], Е. С. Егоров[3], Е. М. Мерзляк[3], Д. М. Чудаков[1,3], О.В. Британова[3]

[1]Сколковский институт науки и технологий, Россия, Москва

[2]Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Россия, Москва

[3]Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Россия, Москва

Введение. В тимусе при селекции на MHC-II в комплексе с антигеном отбираются наивные репертуары Т-клеточных рецепторов (ТКР), способных оптимально взаимодействовать с комплексом. В этой работе мы использовали мышей, имеющих полиморфные варианты единственной аллели MHC-II: H2-A^b и H2-A^j. Фенотипически присутствие H2-Aj выражается в низкоэффективной селекции CD4+ Т-клеток и в чувствительности к туберкулезу. В модели также присутствует полиморфный вариант H2-O белка, регулирующего загрузку антигена в MHC-II. Мы показали, что полиморфизм H2-A приводит к селекции измененных наивных репертуаров ТКР.

Материалы и методы. Из мышей линий C57Bl/6 (H2-A^b), B6.I-9.3.19.8 (H2-A^j) [1] и C57Bl/6 H2-Ob$^{-/-}$ [2] методом клеточной сортировки были получены наивные популяции CD4+ конвенциональных Foxp3- Т-клеток (nTconv) и регуляторных Foxp3+ Т-клеток (nTreg). Полученные с помощью 5'-RACE технологии и с использованием молекулярных баркодов кДНК библиотеки α- и β-цепей ТКР были отсеквенированы на платформе Illumina. Была проанализирована структура репертуаров и предсказаны физико-химические свойства CDR3.

Результаты. Селекция nTconv на H2-A^j ведет к образованию менее разнообразного репертуара ТКРβ, с большим количеством публичных Т-клеточных клонов для данной линии мышей. nTreg и nTconv, прошедшие селекцию на H2-A^j, имеют CDR3α и CDR3β участки с предсказанной высокой способностью связывать антиген. При этом H2-A^j ограничивает отбор ТКР с сильно-связывающими MHC-II Vα-сегментами. Был найден аминокислотный мотив (D)WG, характерный для CDR3β nTreg. Мы не обнаружили разницы между физико-химическими свойствами CDR3 C57Bl/6 и C57Bl/6 H2-Ob$^{-/-}$.

Выводы. H2-Aj вносит ограничения в селекцию CD4+ Т-клеток. Влияние полиморфизма H2-O в данной модели не выявлено.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда №16-15-00149 и гранта РФФИ 19-015-00082.

Список литературы.

1. Logunova, Korotetskaya, Polshakov, Apt, J. PLoS Genet. 11(11), 1–22 (2015).
2. Denzin et al., Immunity. 47, 310–322 (2017).

Д3. Особенности stx-конвертирующего бактериофага φ24B

А.С. Кузнецов (alexbluesking@gmail.com)[1,2], Е.Е. Куликов[2,3], К.М. Бойко[4], П.А. Иванов[2], А.К. Голомидова[2], А.Д. Ефимов[2], А.В. Летаров[1,2].

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

[2]Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва

[3]Московский физико-технический институт, Россия, Москва

[4]Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва

Введение. Продукция шигаподобного токсина (Stx) некоторыми патогенными штаммами *Escherichia coli* (например, серотипа O:157) является следствием лизогенной конверсии [1]. Ген stx присутствует в геномах нескольких видов лямбдоидных фагов. Ключевой стадией инфекции для бактериофагов служит адсорбция на поверхности клетки-мишени. Известно, что stx-конвертирующий бактериофаг φ24B в качестве конечного рецептора распознает белок BamA, однако рецептор-распознающий белок фага не идентифицирован. Также остается открытым вопрос о преодолевании фагом слоя О-антигена, экранирующего белок BamA [2]. Целью данной работы является изучение деталей адсорбции φ24B путем анализа потенциальных рецептор-распознающих белков бактериофага и описания, полученных по этому фагу лизогенов.

Материалы и методы. В ходе работы индукцией лизогенов получили препарат фага φ24B, изучена морфология вирионов методом криоэлектронной микроскопии. Для исследования потенциальных белков адсорбционного аппарата gp56 и gp61 в рекомбинантном виде получили соответствующие плазмидные конструкции и трансформантов. Далее выделяли эти белки и анализировали методом электрофореза в ПААГ. Также получили лизогенов по φ24B и их ЛПС-профили в соответствии с методикой [2].

Результаты. Фаговые частицы имеют морфологию подовирусов. Успешно синтезированы рекомбинантные белки gp56 и gp61. Также обнаружили появление альтернативной формы белка gp61-59 при экспрессии гена 61, что можно объяснить наличием последовательности потенциального рибосомального программируемого фреймшифта между рамками 61 и 59. Анализ ЛПС полученных лизогенов показал отсутствие нормального О-антигена, при этом штаммы, заведомо лишенные О-антигена, имели более высокую эффективность лизогенизации.

Выводы. Полученные данные говорят в пользу программируемого рибосомального фреймшифта при синтезе белка gp61. Наличие двух форм белка может иметь значение для адсорбции и определения спектра хозяев. Также показано, что φ24B не способен инфицировать *in vitro* лабораторные штаммы *E. coli*, имеющие О-антиген, но заражает клетки без О-антигена. По всей видимости, вирион φ24B не имеет механизмов преодоления слоя из О-антигена, отличного от 157 типа.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда № 15-15-00134П.

Список литературы.

1. D. Sváb et al., Infect. Genet. Evol. 29, 42-47 (2015)V. I. Bunik et al., 19th Tetraheron Symposium, Riva del Garda, Italy, 2018.
2. E. E. Kulikov et al., Sci. Rep. T. 9, №. 1, 2958 (2019).

Д4. Роль жидко-жидкостного разделения фаз в установлении и поддержании трёхмерной структуры хроматина

М.Д. Магнитов[1,2] (mikhail.magnitov@phystech.edu), С.В. Ульянов[1,3], А.К. Величко[1], А.В. Лужин[1], А.В. Тяхт[1], О.Л. Кантидзе[1]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Россия, Москва

[2]Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Россия, Москва

[3]Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Жидко-жидкостное разделение фаз участвует в формировании безмембранных органелл в ядре клеток, таких как ядрышко, тельца Кахаля и другие [1]. Также известно, что некоторые белки, ассоциированные с хроматином, способны образовывать молекулярные конденсаты в ядре, в связи с чем была предложена модель формирования гетерохроматина за счет разделения фаз [2, 3]. Целью данной работы является изучить эффект 1,6-гександиол-опосредованного нарушения разделения фаз на трехмерную структуру хроматина человека.

Материалы и методы. Эффекты 1,6-гександиол-опосредованного нарушения разделения фаз были изучены на клеточной линии HeLa с помощью методов микроскопии высокого разрешения STORM и высокопроизводительной фиксации конформации хромосом Hi-C. Для обработки данных Hi-C был разработан вычислительный конвейер с использованием алгоритмов поиска и визуализации компартментов, ТАДов и петель.

Результаты. В результате подавления процесса разделения фаз нуклеосомные домены более равномерно распределяются по ядру и увеличиваются в размерах. На уровне компартментов эухроматин и гетерохроматин по-разному отвечают на воздействие 1,6-гександиолом, претерпевая необратимые изменения и частичное перемешивание. Процесс восстановления разделения фаз приводит к еще более сильному перемешиванию компартментов и компактизации гетерохроматина по сравнению с исходным состоянием. На уровне топологически-ассоциированных доменов происходит обратимая компактизация активных доменов и декомпактизация репрессивных. Нарушение процесса разделения фаз не оказывает серьезного влияния на CTCF-зависимые и промотор-промоторные петли, однако приводит к ослаблению энхансер-промоторных петель и усилению дальних взаимодействий между энхансерами.

Выводы. Механизм разделения фаз способствует направлению и ограничению пространственной организации хроматина, однако не является основной движущей силой для поддержания его глобальной и локальной упаковки.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-74-10009.

Список литературы.

1. S. F. Banani et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 18, 285-298 (2017).
2. A. R. Strom et al., Nature 547, 241-245 (2017).
3. M. Falk et al., Nature 570, 395-399 (2019).

Д5. Флуорогенный биосенсор для детекции пероксида водорода

Д.Д. Смолярова (dasha@smolyarova.ru)[1,2], В.В. Пак[2], В.В. Белоусов

[1]МГУ им. М. В. Ломоносова, Россия, Москва

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

Введение. Пероксид водорода относится к активным формам кислорода (АФК) и участвует не только в окислительном стрессе, как считалось ранее, но и в передаче внутриклеточного сигнала. Для изучения распределения H_2O_2 в клетке в пространстве и времени необходимы специфические сенсоры с различными спектральными характеристиками. Поэтому целью этой работы стало создание нового биосенсора на основе чувствительного к перекиси домена и флуорогенного ядра, способного обратимо взаимодействовать с разными нетоксичными красителями, подобными по строению хромофору зеленого флуоресцентного белка (GFP).

Материалы и методы. Собрали библиотеки генетических конструкций: сенсорный домен на основе бактериального транскрипционного фактора OxyR, специфично активирующегося в ответ на присутствие в клетке H_2O_2, соединяли через случайные линкеры с круговым пермутантом флуорогенного белка. Из полученных библиотек выбрали конструкцию, которая обладала наибольшим увеличением флуоресценции при взаимодействии с H_2O_2, и подвергли ее сайт-направленному случайному мутагенезу. Итоговый вариант сенсора исследовали на культуре клеток HeLa Kyoto и определили некоторые кинетические и фотохимические свойства *in vitro*.

Результаты. Созданный биосенсор в комплексе с флуорогенным красителем 4-гидроксибензилиден-роданином, флуоресцирующим в красной области спектра, превосходит существующий сенсор HyPerRed по яркости и амплитуде ответа. Так, новый биосенсор способен обратимо окисляться H_2O_2, при полном окислении обеспечивая увеличение интенсивности флуоресценции в 9-12 раз.

Выводы. Новый биосенсор обладает рядом преимуществ по сравнению с существующими аналогами: сигнал флуоресценции возобновляем за счет обратимого взаимодействия с красителем, спектральные свойства сенсора возможно изменять за счет добавления разных флуорогенных красителей, а также можно будет использовать сенсор для микроскопии сверхвысокого разрешения благодаря обратимости взаимодействия с хромофором и в анаэробных условиях, так как для созревания флуоресцентного ядра не нужен кислород.

Список литературы.

1. Ermakova Y.G. et al., Nat. Commun. 2014. V. 5. No1. P. 5222.
2. Chudakov D.M. et al., Physiol. Rev. 2010. V. 90. No3. P. 1103–1163.
3. Zheng M. et al., Science. 1998. V. 279. No5357. P. 1718–1721.
4. Sies H., Redox Biol. 2017. V. 11. P. 613–619.
5. Plamont, A.-M. et al., PNAS. 2016, №3. p. 497–502.

Д6. Мутация в гене HTT влияет на уровень экспрессии цитоскелетных белков, организацию цитоскелета и подвижность культивируемых кожных фибробластов пациентов с болезнью Гентингтона

А.С. Таран (Eva8326@yandex.ru)[1], О.А. Зубкова[2], А.Е. Харитонов[2], М.А. Лагарькова[2], И.Б.Алиева[3]

[1]МГУ им. Ломоносова, факультет биоинформатики и биоинженерии, Москва

[2]Федеральный научный клинический центр физико-химической медицины федерального медико-биологического агентства, Москва

[3]НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ им. Ломоносова, Москва

Введение. Болезнь Гентингтона (БГ) – неизлечимое наследственное аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, поражающее лиц среднего возраста. Причина развития болезни - экспансия CAG-повторов в гене белка гентингтина (huntingtin, HTT). Функция HTT у человека не выяснена, однако показано, что HTT экспрессируется во всех тканях человеческого организма и взаимодействует с белками, участвующими в транскрипции, передаче сигнала в клетке и внутриклеточном транспорте.

Материалы и методы. В настоящей работе были использованы культивируемые фибробласты, полученные из биоптата кожи здоровых доноров и пациентов, страдающих БГ. Количественную оценку различий содержания изоформ цитоскелетных белков проводили методом вестерн-блоттинга. Изменения внутриклеточной архитектуры компонентов цитоскелета исследовали методами иммуноцитохимии с помощью флуоресцентной микроскопии SIM (Structural Illuminational Microscopy). Для изучения функциональных нарушений клеточной подвижности использовали прижизненные наблюдения за поведением клеток в стандартных физиологических тестах (распластывение и выползание в экспериментальную рану).

Результаты. В результате мутации в гене HTT не происходит изменений в уровне экспрессии тубулинов, γ- и β-актина, однако, меняется взаимная организация микротрубочек и актиновых структур в цитоплазме клетки, а также изменяется количество фибробластов, экспрессирующих α-гладкомышечный актин. Физиологические тесты, выполненные в ходе прижизненных наблюдений, показали, что фибробласты пациентов с БГ демонстрируют измененную динамику прикрепления и распластывания на субстрате.

Выводы. Полученные результаты впервые показывают, что биохимические и морфологические изменения, вызванные мутацией в гене HTT при БГ влияют на структуру цитоскелета, приводя к изменению клеточного распластывания и подвижности.

Поддержано РНФ (грант №19-15-00425) и Программой развития Московского государственного университета (Moscow State University Development Program PNR 5.13.).

Д7. Оценка терапевтического действия IgA антител в мышиной модели колоректального рака

А.Г. Якупова[1] (iakupovaalisa@gmail.com), М.А. Бондарева[2], С.И. Гривенников[3], А.А. Круглов[2,4]

[1]Кафедра Молекулярной биологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва,119234

[2]Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

[3]Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, 19111 United States

[4]German Rheumatism Research Center (DRFZ), a L eibniz Institute, Berlin, 10117 Germany

Введение. Микробиота – это комменсальное сообщество, играющее важную роль в гомеостазе организма-хозяина. Однако механизмы контроля микробиоты иммунной системой и влияние их на развитие болезней остаются невыясненными. Одним из механизмов регуляции состава микробиоты является продукция иммуноглобулина А (IgA) иммунной системой. Поэтому в данной работе нами был изучен вопрос о том, как различные клоны микробиото-специфического иммуноглобулина А (IgA) могут определять развитие тех или иных заболеваний. Для этого нами была оценен вклад данных антител на протекание канцерогенеза в мышиной модели колоректального рака и проведен анализ структур, распознаваемых этими IgA антителами в комменсальной микробиоте

Материалы и методы. Колоректальный рак индуцировался в мышах посредством введения тамоксифена. После индукции заболевания мышам внутрибрюшинно вводили отобранные клоны IgA(20 мкг/г) на протяжении пяти недель. По окончании эксперимента был оценен размер и количество опухолей, проанализированы популяции иммунных клеток из *lamina propria* и интраэпителиального слоя толстой кишки методом проточной цитофлоуориметрии. Для определения антигенной структуры на поверхности бактерий лизат кишечной микробиоты был проанализирован с помощью вестерн-блота с использованием данных моноклональных IgA антител и последующей масс-спектрометрии обнаруженных белков.

Результаты. Применение моноклональных IgA антител, распознающих липотейхоевую кислоту, в модели колоректального рака оказывало патогенный эффект на рост опухоли. Наблюдаемое увеличение количества опухолей, снижение веса животных было ассоциировано с уменьшением популяций CD4+ Т-, клеток, производящих IL-17A, и CD8+ Т-клеток, продуцирующих интерферон гамма. Наконец, для другого IgA антитела была выяснена специфичность в отношении компонента системы ABC-транспортеров.

Выводы. Таргетирование определенных бактериальных эпитопов посредством IgA может приводить к усиленному развитию колоректального рака.

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

Секция «Биохимия»

Б1. Разработка модельной системы для исследования уровня протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A при гипертрофии миокарда

Д.А. Адашева (nesterova.darya97@gmail.ru), Д.В. Серебряная
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Введение. Гипертрофия миокарда – состояние, сопровождающее сердечную недостаточность (СН). Белок IGFBP-4 расщепляется под действием матриксной металлопротеазы PAPP-A по специфическому сайту с образованием двух протеолитических фрагментов [1]. Ранее было показано, что уровень данных фрагментов повышается в крови больных СН [2]. Молекулярный механизм увеличения уровняпротеолитических фрагментов IGFBP-4 в крови пациентов с СН остается неизученным. Таким образом, целью данной работы являлась разработка модельной системы для исследования уровня протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A при гипертрофии миокарда.

Материалы и методы. Работу проводили на первичной культуре кардиомиоцитов крысы, полученной из сердец неонатальных крыс [3]. Гипертрофию в полученной культуре индуцировали добавлением 100 нМ эндотелина-1. Измерение уровня протеолиза IGFBP-4 проводили методом флуороиммунного анализа с использованием антител, специфичных к неоэпитопу, образующемуся в результате расщепления IGFBP-4 под действием PAPP-A.

Результаты. Получена первичная культура из сердец неонатальных крыс с содержанием кардиомиоцитов около 80%. В полученной культуре обнаружено накопление протеолитических фрагментов IGFBP-4, ассоциированных со специфической активностью PAPP-A. При гипертрофии уровень протеолиза IGFBP-4 возрастает в 1.5 раза. PAPP-A, экспрессируемый кардиомиоцитами, вносит основной вклад в расщепление IGFBP-4 при гипертрофии, по сравнению с другими клетками культуры.

Выводы. В полученной культуре происходит протеолиз IGFBP-4, ассоциированный с PAPP-A. При гипертрофии наблюдается повышение уровня протеолиза IGFBP-4. Показано, что увеличение уровня протеолиза IGFBP-4 при гипертрофии ассоциированно с PAPP-A, экспрессируемым кардиомиоцитами.

Список литературы.

1. Monget P., Oxvig C. Ann. Endocrinol. (Paris). 77, 90–96 (2016).
2. Postnikov et al., European Journal of Heart Failure. 20, 466. (2018).
3. Степанова О.В. и др. Кардиологический вестник. VII(XIX). №1, 10-14. (2012).

Б2. Определение содержания изоформ SAA1 и SAA2 человека в образцах плазмы крови методом иммуноблоттинга

А.Г. Арфанян (arfanyan@yandex.ru), А.В. Слущёв (sav_1414_fa@mail.ru), С.В. Козловский, П.А. Руденко
МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биохимии

Введение. Сывороточный амилоид А (SAA) – название семейства белков, циркулирующих в крови млекопитающих. У человека обнаружено две изоформы SAA, которые являются белками острой фазы воспаления: SAA1 и SAA2. Их уровень в крови многократно увеличивается при воспалении. В ряде работ высказывается предположение, что соотношение изоформ может играть важную диагностичекую и прогностическую роль при разных заболеваниях. Однако изучение этого вопроса осложняется отсутствием метода, позволяющего напрямую измерить точное количество каждой изоформы.

Целью работы было подобрать условия для измерения уровня SAA1 и SAA2 человека в образцах плазмы крови методом иммуноблоттинга.

Материалы и методы. В ходе работы экспрессировали рекомбинантные SAA1 и SAA2 в клетках *E.coli*. Очистку белков из фракции растворимых клеточных белков проводили методом аффинной хроматографии на носителе с иммобилизованными моноклональными антителами, специфичными к SAA человека. Очищенные рекомбинантные SAA1 и SAA2 использовали для отбора антител, которые специфически взаимодействуют с одной из изоформ. Методом иммуноблоттинга с использованием подобранных антител определяли уровень нативных SAA1 и SAA2 в четырех образцах плазмы крови доноров с воспалением. Рекомбинантные SAA1 и SAA2 использовали в качестве калибраторов.

Результаты. В результате работы были получены высокоочищенные (> 95%) рекомбинантные SAA1 и SAA2 человека. Были выбраны моноклональные антитела SAA99 и 2SAA54 для специфического иммунохимического окрашивания SAA1 и SAA2, соответственно. Уровень SAA1, определенный методом иммуноблоттинга в образцах плазмы крови доноров с воспалением, составил 61-243 мкг/мл (среднее: 120 мкг/мл), а уровень SAA2 - 16-36 мкг/мл (среднее: 26 мкг/мл). Относительное содержание изоформы SAA1 составило 73-88% (среднее 80%) от общего уровня SAA.

Выводы. В результате проделанной работы удалось определить содержание изоформ SAA1 и SAA2 в образцах плазмы доноров с воспалением методом иммуноблоттинга.

Б3. Индуцированная гипохлоритом окислительная модификация фибриногена

А. А. Беляева (belyevaanna89@gmail.com), Л.В. Юрина, А.Д. Васильева
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук, Россия, Москва. Россия, Московская область.

Введение. В отличие от внутриклеточных белков, белки плазмы практически не защищены антиоксидантными ферментативными системами. Молекулы фибриногена представляют собой мишень для активных форм кислорода(АФК). Известно, что фибриноген является в 20 раз более чувствительным к окислительной модификации по сравнению с другими основными белками плазмы. Посттрансляционные модификации, вызванные окислением, индуцируют нарушения функциональных свойств фибриногена, в том числе нарушается процесс тромбообразования.

Материалы и методы. Фибриноген был выделен из цитратной плазмы крови человека методом глицинового осаждения. Окисление фибриногена было индуцировано раствором гипохлорита (Sigma-Aldrich, США, SHBJ5633). Электрофорез проводили в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методике Laemmli. Фореграммы окрашивали coomasie brilliant blue (R250). Хромато-масс-спектрометрический анализ (ВЭЖХ-МС/МС) проводился на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 с системой автоматического отбора проб (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) и тандемного масс-спектрометра 7T LTQ-FT Ultra (Thermo, Bremen, Germany).

Результаты. Показано, что при окислении фибриногена высокой концентрацией гипохлорита, наблюдается частичная и полная фрагментация белка, меньшая концентрация не вызывает деградацию белка. Наибольшее число сайтов окисления приходится на остатки метионина и циклические аминокислоты (αC-домена), которые являются наиболее доступными для окислителя. В ходе работы были выявлены как уже известные окисляемые остатки метионина, так и совершенно новые.

Выводы. Окисление фибриногена индуцирует ингибирование тромбообразования. Замечено, что наименее уязвима к действию окислителей в фибриногене область E, наиболее функционально значимая. Аминокислотные остатки и пептидные фрагменты, играющие ключевую роль в функционировании фибриногена сохраняют структурную целостность.

Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования по Государственному заданию (тема 0084-2014-0001) и при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-04-01313. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского научного фонда 16-14-00181. 2

Б4. Олиго-1,6-гликозидаза *Exiguobacterium sibiricum*. Сайт-направленный мутагенез для увеличения термостабильности

Я.Ю. Берлина (yabelina@gmail.com), Л.Е. Петровская
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Введение. Олиго-1,6-гликозидаза – фермент, который расщепляет 1,6-гликозидные связи и применяется в промышленности вместе с 1,4-гликозидазами для расщепления крахмала и гликогена до глюкозы. Ген олиго-1,6-гликозидазы (EsOgl) был обнаружен в геноме психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum*, выделенной из вечной мерзлоты [1], амплифицирован при помощи ПЦР и клонирован в вектор для экспрессии в *Escherichia coli*. Анализ аминокислотной последовательности EsOgl позволил предположить, что данный белок может быть отнесён к холодоактивным ферментам.

Материалы и методы. Клонирование ДНК и сайт-направленный мутагенез проводили с использованием стандартных методов генной инженерии. Рекомбинантный белок EsOgl получен в клетках *E. coli* и очищен при помощи металлоаффинной хроматографии. Каталитическую активность EsOgl изучали колориметрическим методом с использованием п-нитрофенил-α-D-глюкопиранозида в качестве субстрата.

Результаты. Исследование зависимости активности EsOgl от температуры показало, что для него характерен низкий температурный оптимум (25°C), а также низкая термальная стабильность. Из литературных источников известно, что введение остатков пролина в определенные положения существенно повышает термостабиль-

ность олиго-1,6-глюкозидаз [2]. Проведено выравнивание аминокислотной последовательности EsOgl с термостабильными гликозидазами и определено положение остатков для сайт-направленного мутагенеза в целях повышения термостабильности. При помощи ПЦР получено четыре точечных мутанта EsOgl. Установлено, что мутантные варианты демонстрируют более высокую термостабильность по сравнению с диким типом (для одного из мутантов остаточная активность при 45°C возрастает в 6 раз). При этом кинетические константы меняются незначительно.

Выводы. Для исследуемой олиго-1,6-гликозидазы введение остатков пролина в состав неструктурированных петель, β-изгибов и в начало α-спиралей существенно повышает термостабильность фермента, сохраняя его кинетические характеристики.

Список литературы.

1. Debora F Rodrigues, Natalia Ivanova, Zhili He, Marianne Huebner, Jizhong Zhou and James M Tiedje Architecture of thermal adaptation in an Exiguobacterium sibiricum strain isolated from 3 million year old permafrost: A genome and transcriptome approach (2008).
2. Watanabe Suzuki Protein thermostabilization by proline substitutions (1997).
3. Watanabe Multiple Proline Substitutions Cumulatively Thermostabilize Bacillus Cereus ATCC7064 Oligo-1,6-Glucosidase (1994).

Б5. Кристаллизация и структурный анализ мутантных форм тиоцианатдегидрогеназы из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* с заменами K281A и K264A, K267A

Л.А. Варфоломеева (larisaavarfolomeeva@gmail.com)[1], К.М. Поляков[2], А.С. Комолов[3], Т.В. Ракитина[3], Т.В. Тихонова[1], В.О. Попов[1]

[1]Федеральный исследовательский центр Биотехнологии РАН

[2]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

[3]Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Введение. Медь-содержащий фермент тиоцианатдегидрогеназа (TcDH), который содержит новый, неописанный ранее трехатомный медный кластер, катализирует одностадийное окислительное разложение тиоцианата до цианата и элементной серы с переносом электронов на цитохром с. Этот процесс является первой стадией дыхательного цикла галоалкалофильных бактерий рода *Thioalkalivibrio* при росте их на тиоцианате как единственном источнике энергии. Трехмерная структура TcDH была решена методом рентгеноструктурного анализа (РСА), однако кристаллы фермента были двойниками, вследствие чего, точно установить координацию ионов меди не удавалось. Фермент в кристалле образовывал тетрамер и упаковывался в слои. Было сделано предположение, что разрушение контактов между димерами в тетрамере может привести к смене упаковки и исчезновению двойникования, поэтому было предложено получить мутантные формы белка с заменами по остаткам, участвующим в формировании тетрамера.

Материалы и методы. Два мутанта TcDH с заменами K281A и K264A, K267A были экспрессированы в клетках *E. coli* и очищены с использованием двух металлоаффинных хроматографий и последующей гель-фильтрации. Ферменты активировались ионами меди перед кристаллизацией. Для каждого из мутантов проводился скрининг условий кристаллизации и дальнейшая оптимизация найденных условий. С кристаллов собирали наборы дифракционных данных и их обработку осуществляли с помощью пакета программ CCP4.

Результаты. Кристаллы мутанта с двумя заменами K264A, K267A дифракции не давали. Кристаллы мутанта с заменой K281A из одних условий были двойниками, и молекулы фермента образовывали тетрамер, в то время как кристаллы того же мутанта из других условий принадлежали к другой пространственной группе и представляли собой монокристаллы. Упаковка молекул белка и структура тетрамера изменились.

Выводы. Получены кристаллы-двойники и монокристаллы мутанта TcDH с заменой K281A и решены его структуры методом РСА с разрешением 1.95 Å.

Б6. Гипохлорит-индуцированная окислительная модификация плазминогена: структурно-функциональные нарушения

Е.С. Гаврилина (e.gavrilina98@gmail.com), В.С.Иванов, А.Д. Васильева, Л.В. Юрина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук, Россия, Москва.

Введение. Белки представляют собой высокочувствительные мишени для активных форм кислорода (АФК). Окислительные модификации белков могут вызывать нарушение их структуры и механизма функционирования. Плазминоген, будучи предшественником плазмина, основная функция которого заключается в осуществлении внутрисосудистого тромболизиса, является полностью неизученным белком плазмы крови в отношении его посттрансляционных окислительных модификаций и, как следствие, структурных нарушений.

Материалы и методы. Glu-плазминоген был изолирован из плазмы крови доноров методом аффинной хроматографии на Lys-сефарозе 4B (Amersham, Англия). Фибриноген был выделен из цитратной плазмы крови человека методом глицинового осаждения. Превращение плазминогена в плазмин осуществляли стрептокиназой (Bechringwerke, Германия). Электрофорез проводили в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методике Laemmli. Окисление плазминогена было индуцировано раствором гипохлорита (Sigma, SHBJ5633). Хромато-масс-спектрометрический анализ (ВЭЖХ-МС/МС) проводился на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 с системой авто-матического отбора проб (AgilentTechnologiesInc., SantaClara, USA) и тандемного масс-спектрометра 7T LTQ-FT Ultra (Thermo, Bremen, Germany).

Результаты. Выяснилось, что малое количество окислителя вовлекало в процесс окисления только домены KR-2, KR-4 и SP, в то время как при более высоком количестве окислителя все структурные области плазминогена и плазмина были окислены. Наибольшее число сайтов окисления приходится на остатки метионина и циклические аминокислоты, среди которых триптофаны были наиболее доступными для окислителя. Окисление плазмина сопровождалось образованием дополнительных центров окисления в белке, отсутствующих в окисленном плазминогене.

Выводы.Менее свернутая структура плазмина по сравнению с компактной структурой плазминогена становится более уязвимой для действия АФК. Обсуждается антиоксидантная роль метиониновых остатков в сохранении целостности ключевых остатков плазминогена.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда № 16-14-00181.

Б7. Взаимодействие противоопухолевого соединения галетерона с цитохромом P450 21A2 (CYP21A2)

Я.И. Гавриченко (yar-12@mail.ru)[1], Т.А. Филиппова[1], Р.А. Масамрех[1,2], К.А. Щербаков[2], А.В. Кузиков[1,2]

[1]Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, Москва

[2]Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ)

Введение. Использование ингибиторов цитохрома P450 17A1 (CYP17A1) – ключевого фермента биосинтеза андрогенов – и антагонистов рецептора андрогенов опухолевых клеток является эффективной стратегией лечения рака предстательной железы. Основным побочным эффектом фармакотерапии рака предстательной железы является нарушение биосинтеза кортикостероидных гормонов. Препарат галетерон перспективен для лечения рака предстательной железы, однако побочные действия галетерона, в том числе его влияние на биосинтез кортикостероидов, остаются практически неизученными. Целью данной работы является исследование взаимодействия галетерона с одним из ключевых ферментов биосинтеза кортикостероидных гормонов – стероид 21-монооксигеназой (CYP21A2).

Материалы и методы. Взаимодействие галетерона с активным центром CYP21A2 было исследовано методами абсорбционной спектроскопии и молекулярного докинга. Кинетический анализ проводился с использованием реконструированной монооксигеназной системы.

Результаты. Методом абсорбционной спектроскопии показано, что галетерон индуцирует спектральные изменения CYP21A2, характерные для субстратов цитохрома P450. Значение константы диссоциации комплекса галетерона с CYP21A2 определено как 3,1 ± 0,7 мкМ. Молекулярным докингом предсказано наиболее вероятное расположение молекулы галетерона в активном центре CYP21A2: бензимидазольный фрагмент галетерона размещается практически параллельно плоскости гема фермента, что исключает возможность образования координационной связи между его атомом азота и ионом железа гема, 3-OH группа галетерона образует водородную связь с остатком Arg234 CYP21A2, стероидный фрагмент галетерона образует множество гидрофобных контактов с аминокислотными остатками активного центра. Кинетический анализ с использованием реконструированной монооксигеназной системы выявил, что галетерон ингибирует 21-гидроксилазную активность CYP21A2 по конкурентному типу. Значение константы ингибирования составило 12 ± 3 мкМ.

Выводы. Показано, что галетерон проявляет свойства конкурентного ингибитора CYP21A2. Полученные данные расширяют представление о возможных побочных эффектах галетерона.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 19-315-70003.

Б8. Получение и исследование свойств рекомбинантного химерного белка, содержащего сердечную изоформу тропонина I и тропонина C человека

А.И. Горбенкова (anastasia.gorbenkova@yandex.ru), А.А. Артамонова,
МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биохимии

Введение. Иммунохимическое определение концентрации сердечной изоформы тропонина I (cTnI) является одним из методов диагностики инфаркта миокарда. cTnI представлен в кровотоке больного не в свободной форме, а в составе двойного (TnIC) или тройного тропонинового комплекса [1]. Сейчас в качестве стандарта рекомендуется использовать нативный тройной комплекс. Мы задались целью получить и исследовать альтернативный стандарт – рекомбинантный химерный белок (chimTnIC), содержащий cTnI и тропонин C (TnC).

Материалы и методы. Химерный белок состоял из последовательности cTnI, гибкого 19-членного Gly-Ser линкера и последовательности TnC [2]. На основе вектора pET28a+ получали молекулярно-генетическую конструкцию, содержащую ген chimTnIC. Правильность конструкции подтверждали методами ПЦР, рестриктного анализа и секвенирования. ChimTnIC экспрессировали в штамме *E. coli* Rosetta2(DE3) pLysS. Целевой белок очищали методом аффинной хроматографии на носителе с иммобилизованными моноклональными антителами, специфичными к различным участкам cTnI. Стабильность cTnI исследовали, проводя инкубацию chimTnIC, нативного комплекса TnIC и свободной формы cTnI в сыворотке бычьей крови при 37оС 0-48 часов *in vitro*. Исследование иммунохимической активности и стабильности cTnI в составе chimTnIC проводили методом сэндвич-флуороиммунного анализа с использованием анти-cTnI антител, специфичных к центральным или концевым эпитопам белка.

Результаты. Уровень экспрессии chimTnIC составил 0,4 мкг/мл клеточной культуры. cTnI в составе chimTnIC обладал иммунохимическими свойствами, аналогичными свойствам cTnI в составе нативного комплекса TnIC. Стабильность cTnI в сыворотке бычьей сыворотке в составе химерного белка была сравнима с таковой в составе нативного двойного комплекса и значительно превышала стабильность свободного белка.

Выводы. На основе полученных данных можно заключить, что chimTnIC может быть использован в качестве калибратора для иммунохимических систем, определяющих концентрацию cTnI.

Список литературы.

1. Katrukha et al., ClinChem, 2019.
2. Shi et al., 2006, US 7,078.486 B2.

Б9. Влияние С-конца ε-субъединицы на активность АТФ-синтазы *Bacillus subtilis*

В.М. Зубарева (zubareva.valeriaa@gmail.com)[1], Д.О. Третьяков[1], А.С. Лапашина[1,2], Б.А. Фенюк[1,2]
[1]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва
[2]НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва

Введение. АТФ-синтаза — важнейший фермент, катализирующий синтез АТФ за счет энергии мембранного потенциала. Также он может гидролизовать АТФ, генерируя мембранный потенциал. Гидролитическая активность фермента подвержена неконкурентному ингибированию комплексом Mg-АДФ, а также может ингибироваться С-концом субъединицы ε. [1] В нашей работе изучалось взаимодействие этих типов ингибирования на ферменте *Bacillus subtilis*.

Материалы и методы. Ферментативная активность измерялась на инвертированных мембранных частицах из клеток *Escherichia coli*, экспрессирующих АТФ-синтазу B. subtilis дикого типа или с делецией С-конца ε-субъединицы ($\varepsilon\Delta$C). Синтез АТФ измерялся с помощью люциферин-люциферазной системы, протонный транспорт — флюориметрически, а гидролиз АТФ — спектрофотометрически при различных соотношениях и концентрациях АТФ/АДФ, а также с добавлением фосфата, сульфита и разобщителя.

Результаты. Мембранные частицы обоих штаммов (дикого типа и $\varepsilon\Delta$C) были способны к АТФ-зависимому протонному транспорту. Скорость синтеза и гидролиза АТФ для фермента с делецией была в два раза ниже, чем у фермента дикого типа. При этом добавка АДФ сходным образом тормозила гидролиз АТФ ферментами обоих штаммов, а сульфит, препятствующий MgАДФ-ингибированию, активировал гидролиз АТФ в обоих штаммах в одинаковой степени. Однако, наблюдались и различия: так, у $\varepsilon\Delta$C неорганический фосфат стимулировал гидролиз независимо от АДФ и разобщенности мембран, в то время как для штамма дикого типа этот эффект наблюдался не во всех условиях.

Выводы. Делеция С-конца субъединицы ε приводит к снижению активности АТФ-синтазы, однако этот эффект может быть связан с разностью в экспрессии ферменов. Делеция не оказывает сильного влияния на выраженность MgАДФ-ингибирования. Фосфат по-разному влияет на гидролиз АТФ мембранами дикого типа и мутанта.

Список литературы.

1. A.S. Lapashina and B.A. Feniouk, Biochemistry (Moscow). 83, 1427 – 1449 (2018).

Б10. Исследование влияния одиночных замен в интерфейсе белка 14-3-3ζ на некоторые его характеристики

Д.И. Калачева (d.i.kalacheva74@mail.ru), К.В. Тугаева, Н.Н. Случанко
Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», Россия, Москва

Введение. Белки 14-3-3 человека, связываясь с консервативными фосфомотивами белков-”партнеров”, регулируют множество клеточных процессов [1]. В условиях стресса 14-3-3 могут предотвращать денатурацию и агрегацию некоторых белков вне зависимости от наличия у них фосфомотивов. Этот процесс был назван шаперо-

ноподобной активностью (ШПА) [1,2,3]. Учитывая различия в уровне ШПА димеров и мономеров [2,3], мы предположили, что область димерного интерфейса играет значительную роль в механизмах ШПА. Целью данной работы является исследование некоторых свойств двух форм 14-3-3ζ, содержащих точечные замены в димерном интерфейсе.

Материалы и методы. Создали две генетические конструкции на основе вектора pET23, содержащего вставку с заменой A16C либо S58C, полученную методом сайт-направленного мутагенеза. После очистки целевых белков оценивали их олигомерное состояние методом аналитической гель-фильтрации, термостабильность методом измерения интенсивности триптофановой флуоресценции при постоянном нагревании (ИТФПН) и методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), склонность к образованию дисульфидных связей в условиях мягкого окисления.

Результаты. Получили препараты чистых гомогенных белков с заменами A16C или S58C (~50 мг/л культуральной среды). В случае замены S58C наблюдали уменьшение кажущейся молекулярной массы 14-3-3 при уменьшении его концентрации методом аналитической гель-фильтрации, снижение термостабильности методами ДСК и измерения ИТФПН. В случае замены A16C существенных отличий от 14-3-3ζ дикого типа не наблюдали. В ходе мягкого окисления 14-3-3ζ S58C демонстрировал образование димеров двух типов, а 14-3-3ζ A16C двух мономеров с разной электрофоретической подвижностью.

Выводы. Замена S58C приводит к частичной дестабилизации димеров 14-3-3ζ. Замена A16C не влияет на стабильность димеров. Образование внутримолекуляр-но сшитых мономеров 14-3-3ζ A16C и межмолекулярно сшитых димеров 14-3-3ζ S58C происходит за счет образования дисульфидных связей между остатками A16C/S58C или одним из трех остатков цистеина в исходной последовательности 14-3-3ζ.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-74-10031.

Список литературы.

1. N. Sluchanko, D. Bustos, Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 20, 1–49 (2019).
2. N.N. Sluchanko, S.G. Roman, N.A. Chebotareva, N.B. Gusev, Arch. Biochem. Biophys. 549, 32-39 (2014).
3. N.N. Sluchanko, N.B. Gusev, FEBS J. 284, 1279-1295 (2017).

Б11. Получение рекомбинантных сердечных изоформ человеческих тропонинов I и T в бактериальной системе экспрессии и реконструкция тропонинового комплекса на их основе

Д.А. Кондратьева (dashustyj@mail.ru), Т.Л. Салупаева (salupaeva@bk.ru)
МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биохимии

Введение. В кардиомиоцитах тропониновый комплекс, состоящий из тропонинов I, C и T, взаимодействует с тонкими филаментами, регулируя сокращение мышцы. При некрозе кардиомиоцитов тропониновый ITC-комплекс попадает в кровь, что позволяет использовать его как маркер инфаркта миокарда. Для определения концентрации ITC-комплекса в крови в качестве стандарта используют эндогенный тропони-

новый комплекс, получение которого сопряжено с рядом сложностей. Целью нашей работы было реконструировать тропониновый комплекс на основе рекомбинантных белков и изучить некоторые его иммунохимические свойства.

Материалы и методы. Тройной тропониновый ITC-комплекс реконструировали методом ступенчатого диализа из отдельных рекомбинантных белков: TnC и сердечных изоформ тропонинов I и T (hcTnI и hcTnT), полученных на основе вектора pET22b в прокариотической системы экспрессии *E. coli* BL21 (DE3) и очищенных методом аффинной хроматографии. Тройной комплекс ITC отделяли от двойного IC методом гель-фильтрации на носителе Superdex 200. Иммунохимические свойства рекомбинантного ITC-комплекса сравнивали с эндогенным комплексом с помощью ФИА (флуороиммунный анализ) с парами антител к тройному комплексу, hcTnI и hcTnT. Стабильность hcTnI в составе полученного ITC-комплекса тестировали посредством инкубации в течение 0-48 часов в коровьей сыворотке при 37°C и последующего анализа методом ФИА.

Результаты. Были получены чистые препараты рекомбинантных hcTnI и hcTnT. Сравнение иммунохимических свойств рекомбинантного и эндогенного комплексов показало, что протестированные антитела с одинаковой аффинностью связываются обоими комплексами. Динамика деградации hcTnI в составе комплексов в коровьей сыворотке оказалась сопоставима для рекомбинантного и эндогенного ITC-комплексов.

Выводы. Был получен препарат рекомбинантного тропонинового ITC-комплекса, который по исследованным иммунохимическим свойствам и стабильности TnI в своем составе сопоставим с эндогенным ITC-комплексом.

Б12. Модуляция системы комплемента человека β-шпилечными антимикробными пептидами

И.А. Кренёв (il.krenevv13@yandex.ru)[1,2], Е.С. Умнякова[2], В.Н. Кокряков[1,2], М.Н. Берлов[1,2], С.В. Баландин[3], П.В. Пантелеев[3], Т.В. Овчинникова[3]

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

[2]Институт экспериментальной медицины, Россия, Санкт-Петербург

[3]Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Россия, Москва

Введение. Комплемент, одна из систем сериновых протеиназ сыворотки крови, важный компонент иммунитета. Его активация по классическому, альтернативному и лектиновому пути приводит к генерации анафилатоксинов, опсонинов и формированию мембраноатакующего комплекса. Высокую актуальность имеют поиск и характеристика терапевтических модуляторов, в первую очередь ингибиторов, комплемента. Цель исследования - изучение влияния β-шпилечных антимикробных пептидов арениципа-1 (Ar-1) из *Arenicola marina*, тахиплезина I (Tach I) из *Tachypleus tridentatus,* гомезина (Gom) из *Acanthoscurria gomesiana*, танатина-1 (Than-1) из *Podisus maculiventris*, протегрина-1 (PG-1) из *Sus scrofa* на активацию системы комплемента человека по альтернативному пути *in vitro*.

Материалы и методы. Влияние пептидов на активацию комплемента по альтернативному пути оценивали с помощью комплемент-зависимого лизиса эритроцитов кролика и в системах ИФА для регистрации анафилатоксинов C3a и C5a.

Результаты. Ar-1 в концентрациях 10-40 мкг/мл активирует, а в концентрациях 80-160 мкг/мл ингибирует систему комплемента. Tach I ингибирует комплемент в концентрации 160 мкг/мл. Gom, Than-1, PG-1 не влияют на активацию системы комплемента человека. В аминокислотной последовательности Ar-1 и Tach I первые две N-концевые позиции занимают остатки R/KW-, а перед C-концевым дипептидом стоят остатки -YRR-. В Gom, гомологе Ar-1 и Tach I, данные позиции заняты остатками с другими свойствами. Than-1 и PG-1 не являются гомологами между собой и по отношению к Ar-1, Tach I и Gom. В последовательности их аминокислот отсутствуют найденные паттерны.

Выводы. Ar-1 и Tach I, но не Gom, Than-1 и PG-1, модулируют активность системы комплемента человека по альтернативному пути *in vitro*. Вероятно, эта способность обеспечивается присутствием остатков R/KW- на N-конце молекул и последовательности -YRR- перед C-концевым дипептидом.

Б13. Получение рекомбинантного GFAP крысы и изучение его иммунохимических свойств

П.А. Лозбина (polina.lozbina@gmail.com), С.А. Шевченко, И.А. Катруха, В.М. Шатов
МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биохимии

Введение. Глиальный фибриллярный кислый белок (glial fibrillary acidic protein, GFAP) является компонентом промежуточных филаментов астроцитов, кератиноцитов, остеоцитов и некоторых других типов клеток. Измерение содержания GFAP в лимфе или крови применяют для диагностики патологий ЦНС (в том числе инсульта и травм головного мозга). Иммуноцитохимическое определение GFAP используют для идентификации глиальных клеток при проведении различных исследований нервной ткани. Одним из наиболее распространенных животных для исследования заболеваний ЦНС является серая крыса (Rattus norvegicus). У нас имелась система иммунохимической детекции GFAP человека: рекомбинантный белок и два моноклональных антитела (мАт) (GFAP81 и GFAP83), специфичных к человеческому GFAP. Целью нашей работы стало создание системы детекции GFAP крысы. Для этого мы получили рекомбинантный белок-стандарт и исследовали взаимодействие с ним имеющихся мАт в различных приложениях.

Материалы и методы. кДНК GFAP крысы получали путем обратной транскрипции мРНК, выделенной из мозга животного. Молекулярно-генетичекие конструкции для экспрессии рекомбинантного GFAP, содержащие полученную кДНК или кодонно-оптимизированный синтетический ген, создали на основе векторов pET22b(+) и pET28a(+) соответственно. Экспрессию GFAP проводили в клеточной культуре *E. coli* BL-21(DE3). Исследование взаимодействия GFAP81 и GFAP83 с полученными рекомбинантными GFAP крысы проводили методами Вестерн-бломтинга, «сэндвич»-флуороиммунного анализа (ФИА) и иммуноцитохимического окрашивания первичной культуры клеток мозга крысы.

Результаты и выводы. Уровень экспрессии синтетического гена GFAP был в 2,4 раза выше, чем уровень экспрессии кДНК, выделенной из мозга крысы. Антитела GFAP81 и GFAP83 эффективно взаимодействуют с крысиным рекомбинантным белком при проведении Вестерн-бломтинга и иммунного анализа. При проведении иммунохимического окрашивания GFAP крысы в культуре клеток предпочтительно использовать антитело GFAP81. Таким образом, систему, созданную в ходе нашей работы, можно использовать в различных приложениях для детекции GFAP крысы.

Б14. Функциональная значимость неупорядоченных участков в структуре тропомиозина

М.А. Марченко (marchenko_m@mail.bio.msu.ru)[1,2], В.В. Нефедова[1,2], А.М. Матюшенко[1], Д.И. Левицкий[1]
[1]ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва
[2]Московский Государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. В регуляции сокращения поперечно-полосатых мышц участвует множество белков, в том числе, тропомиозин (Tpm). Tpm – это димерный α-спиральный белок, образующий протяженный тяж вдоль актинового филамента. Tpm1.1 является основной изоформой Tpm, обнаруживаемой в скелетных мышцах. В своей работе мы сконцентрировались на 2-х неструктурированных участках (Ala134 и Glu218) молекулы белка, связанных с появлением разрывов между соседними α-спиралями. В литературе главенствует гипотеза, что подобные области нестабильности способствуют правильному связыванию Tpm с актиновым филаментом. Для проверки этой гипотезы мы создали и исследовали два мутанта: A134L и E218L, которые стабилизировали структуру разупорядоченных участков.

Материалы и методы. Дифференциальная сканирующая калориметрия, круговой дихроизм, ограниченный протеолиз трипсином, светорассеяние, оптическая ловушка, *in vitro* motility assay.

Результаты. Мы показали, что мутация A134L влияет на структуру центральной области Tpm1.1 и предотвращает протеолиз после R133, однако не вызывает изменений в доменной организации молекулы. Замены A134L и E218L также не влияли на сродство Tpm1.1 к актину. Молекулы Tpm с мутациями образовывали более стабильные комплексы с актином по сравнению с комплексом актин-Tpm1.1 дикого типа. В системе *in vitro* motility assay мы обнаружили, что мутанты способствуют взаимодействию комплекса актин-Tpm с миозином. При этом сила, генерируемая молекулой миозина в оптической ловушке, с Tpm1.1 E218L не изменялась, а с Tpm1.1 A134L уменьшалась примерно в 2 раза по сравнению с белком дикого типа.

Выводы. Выбранные участки нестабильности рядом с остатками Ala134 и Glu218 не влияют на связывание Tpm с актином, как это предполагалось в литературе. Напротив, расхождения между α-спиралями в структуре белка отвечают за правильное взаимодействие комплекса актин-Tpm с миозином и способствуют тонкой настройке функционирования всего сократительного аппарата.

Б15. Эволюция белков нуклеоплазминового семейства

Е. П. Минина (lisa.minina@gmail.com)[1], А. В. Алексеевский[1,2], Е. В. Шеваль[2]
[1]Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия, Москва
[2]НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Россия, Москва

Введение. Субструктуры клеточного ядра не окружены мембранами, тем не менее способны сохранять стабильную морфологию и постоянство состава образующих их компонентов. Ключевую роль в поддержании целостности ядерных структур играют белок-белковые взаимодействия, а также взаимодействия белков и РНК. Важную роль в организации самой крупной ядерной органеллы - ядрышка - играет белок NPM1. Он входит в состав нуклеоплазминового белкового семейства (семейства NPM), включающего у млекопитающих также белки NPM2 и NPM3. Эти белки

объединяет наличие консервативного N-концевого домена, обеспечивающего олигомеризацию этих белков, что приводит в формированию стабильных пентамеров. Кроме того, у NPM1 имеется менее консервативный C-концевой домен, способный связываться с нуклеиновыми кислотами [1]. Изучение эволюции этих белков может дать новые сведения об эволюции механизмов, обеспечивающих структурную целостность ядрышка.

Материалы и методы. В работе использовались аминокислотные последовательности N-концевых доменов NPM, скачанные из базы данных Uniprot. Анализ последовательностей проводился с помощью алгоритма Muscle (программа Jalview), для работы с филогенетическими деревьями использовалась программа MEGA7 (в построении деревьев использовался алгоритм Neighbor joining).

Результаты. На основании последовательностей N-концевых доменов реконструировано филогенетическое дерево белков семейства. Показано, что белки NPM есть только у животных и близкой к ним группы хоанофлагеллят. Белки семейства делятся на две клады, соответствующие белкам хордовых и белкам беспозвоночных. От белков хордовых отделяются белки позвоночных, которые, в свою очередь, подразделяются на NPM1, NPM2 и NPM3. Белки беспозвоночных лишены C-концевых доменов, за исключением некоторых низших беспозвоночных, а именно трихоплакса, миксоспоридий и гребневиков. Была рассмотрена представленность (факт наличия или отсутствия) белков NPM1, NPM2 и NPM3 у отдельных видов позвоночных. Мы показали, что у всех позвоночных имеется NPM1, однако у некоторых групп позвоночных, например, у птиц и у большинства рыб, полностью отсутствует NPM2. Кроме того, у ряда животных, например, у нематоды Caenorhabditis elegans, белки нуклеоплазминового семейства обнаружены не были, несмотря на наличие оформленного ядрышка. Аминокислотные остатки, необходимые для олигомеризации, оказались в значительной мере консервативными у всех организмов: как беспозвоночных, так и позвоночных.

Выводы. Возможный сценарий эволюции белков нуклеоплазминового семейства представлен на рисунке ниже.

Список литературы.

1. J. K. Box et al., BMC Mol Biol. 17(1) p. 19 (2016).
2. C. Edlich-Muth et al., J Mol Biol. 427, p. 1949-1963 (2015).

Б16. Взаимодействие высокоаффинного аптамера G7-4 с гемагглютининами вируса гриппа А

В.Л. Моисеенко (valerian.moiseenko@gmail.com)
МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химии природных соединений

Введение. Гемагглютинин на поверхности вирусной частицы отвечает за ее прикрепление к клетке хозяина и является потенциальной мишенью для антивирусных агентов. Согласно литературным данным ранее были разработаны ДНК-аптамеры, способные связываться с разными штаммами вируса гриппа А (например, аптамер RHA0385 узнаёт серотипы H5N1, H1N1 и H3N2). В попытках найти минимальный узнающий элемент была изменена первичная структура аптамера RHA0385, и путём удаления концевых участков последовательности, предположительно не участвующих в образовании структуры, был получен аптамер G7-4. Целью данной работы

является изучение взаимодействия этого аптамера с гемагглютининами на поверхности частиц вируса гриппа А и оценка кажущейся константы диссоциации комплексов аптамер-белок.

Материалы и методы. Для определения концентрации вируса использовался метод реакции гемагглютинации (РГА). Определение кажущейся константы диссоциации комплексов проводилось методом интерферометрии биокомплексов на приборе BLItz ForteBio с использованием стрептавидиновых биосенсоров и иммобилизации аптамера. Кажущаяся равновесная константа диссоциации (aKD), константы скорости ассоциации (ka) и скорости диссоциации (kd) рассчитывались в программе OriginPro путем аппроксимации экспериментальных сенсограмм и использования модели связывания Ленгмюра.

Результаты. В качестве регенерирующего агента в экспериментах использовались растворы Tween-20, NaCl и KCl разных концентраций, 1М этаноламина гидрохлорид. Наилучший результат показали 3М KCl и этаноламин. Для комплексов G7-4 и различных штаммов вирусов были получены сенсограммы, экспоненциальная аппроксимация которых позволила охарактеризовать аффинность комплексов.

Выводы. Выбранная на основе анализа литературных данных методика была усовершенствована. Методом интерферометрии биокомплексов были определены кажущиеся равновесные константы диссоциации для комплексов аптамергемагглютинин на поверхности вирусных частиц. Аптамер G7-4, как и известный в литературе аптамер RHA0385, образует высокоаффинные комплексы с разными штаммами вируса гриппа А.

Б17. Получение рекомбинантного N-концевого фрагмента IGFBP-4 для исследования уровня протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A в кардиомиоцитах крысы

К.Э. Трояновский (konstantin.troyanovsky@yandex.ru), Т.Е. Аксинина, В.А. Ковалева, Д.В. Серебряная
МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биохимии

Введение. Фрагменты IGFBP-4, образующиеся в результате протеолиза под действием PAPP-A, являются маркерами сердечной недостаточности (СН). Механизм увеличения уровня протеолиза IGFBP-4 при СН неясен. Одной из возможных моделей исследования механизма протеолиза IGFBP-4 при СН является первичная культура кардиомиоцитов. Целью нашей работы было получение рекомбинантного N-концевого фрагмента IGFBP-4 в экспрессионной системе *E.coli* и его использование для определения уровня протеолиза IGFBP-4 на модели культуры кармиомиоцитов крысы.

Материалы и методы. На основе вектора pET23a+ была получена молекулярно-генетическая конструкция для экспрессии NT-IGFBP4. Правильность полученной конструкции была подтверждена методом секвенирования. Рекомбинантный NT-IGFBP-4 был экспрессирован в клетках *E. coli* штамма Rosetta2(DE3)pLysS и очищен методом аффинной хроматографии. Иммунохимическая активность полученного NT-IGFBP-4 была проанализирована методом ФИА в двух парах антител IBP3-IBP180 и IBP17-IBP180 в сравнении с NT-IGFBP4, полученным в эукариотической системе экспрессии. Уровень протеолиза IGFBP-4 в культуре кардиомиоцитов крысы был также определен методом ФИА в паре антител IBP3-IBP180.

Результаты. Было получено 8 мг препарата рекомбинантного NT-IGFBP4 с чистотой 95%. Иммунохимическая активность NT-IGFBP-4, измеренная в парах антител IBP3-IBP180 и IBP17-IBP180, оказалась в 1.5 раза выше по сравнению с NT-IGFBP-4, экспрессированным в Expi293F. Концентрация NT-IGFBP4 после 3- и 24- часового протеолиза в культуре кардиомиоцитов, составила соответственно 11 и 20 нг/мл, что в 1,5 раза ниже, чем при использовании NT-IGFBP-4 из Expi293F в качестве стандарта.

Выводы. Полученный NT-IGFBP-4 можно использовать в качестве стандарта для определения уровня протеолиза IGFBP-4 на модели культуры кардиомиоцитов крысы.

Секция «Молекулярная и клеточная биология»

M1. Тепловой стресс ингибирует процессинг фрагментов Оказаки в клетках млекопитающих

Б.Г. Аванесян (avanesyanbogdan@gmail.com)[1,2], А.В. Лужин[2], О.Л. Кантидзе[2]
[1]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва
[2]Институт биологии гена РАН, Россия, Москва

Введение. Синтез поли(АДФ-рибозы) (PAR) PAR-полимеразами (PARP) является одним из первых событий в репарации одноцепочечных разрывов ДНК. Распознавание повреждения ДНК PARP1 приводит к её активации и PAR-илированию самого фермента, а также других ДНК-ассоциированных белков. PAR-илирование способствует привлечению факторов репарации к месту разрыва и участвует в регуляции структуры хроматина.

Материалы и методы. В работе была использована модель умеренного теплового стресса – инкубация культивируемых клеток человека при температуре 42-45.5°C в течение 30 минут. Для оценки уровня PAR-илирования использовали непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание с антителами против PAR, совмещенное с эпифлуоресцентной микроскопией и автоматическим анализом изображений. Анализ внутриклеточной локализации PAR проводили с помощью непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания, совмещенного с эпифлуоресцентной микроскопией либо микроскопией высокого разрешения (SIM). Для мечения одноцепочечных участков ДНК в клетке использовали метод никтрансляции *in situ*.

Результаты. Было показано, что кратковременный тепловой стресс приводит к накоплению PAR в ядрах культивируемых клеток человека, находящихся в S-фазе клеточного цикла. Было продемонстрировано, что сайты PAR-илирования почти полностью колокализуются с сайтами репликации ДНК. Нами было выдвинуто предположение, что индуктором такого PARP1-зависимого ответа на повреждение ДНК при тепловом стрессе являются одноцепочечные разрывы в ДНК, образующиеся в результате нарушения процессинга фрагментов Оказаки. Чтобы проверить это мы провели серию экспериментов с эметином – низкомолекулярным соединением, ингибирующим синтез отстающей цепи ДНК. Оказалось, что предварительная инкубация клеток с эметином предотвращает активацию PARP в клетках, подвергнутых тепловому стрессу. В пользу нашей гипотезы свидетельствуют и результаты ник-трансляции *in situ*: включение флуоресцентно меченых аналогов нуклеотидов увеличивается в клетках, подвергнутых действию теплового стресса.

Выводы. Тепловой стресс ингибирует процессинг фрагментов Оказаки и индуцирует ассоциированный с таким ингибированием PARP1-зависимый ответ на повреждение ДНК.

M2. Сайт связывания ppGpp РНК-полимеразы *Escherichia coli*, определяющий сопряжение транскрипции с репарацией ДНК

Е.Г. Афанасьева (lenkaffa@yandex.ru)[1,2]

[1]Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Россия, Москва

[2]Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, кафедра молекулярной биологии, Россия, Москва

Введение. Сигнальная молекула гуанозин-5'-дифосфат-3'-дифосфат (ppGpp) изменяет свойства инициаторного комплекса РНК-полимеразы при ответе бактериальной клетки на стресс. На этапе элонгации транскрипции ppGpp участвует в сопряжении транскрипции с репарацией ДНК, что обеспечивает защиту ДНК клетки от действия генотоксичных агентов. Ранее были описаны два сайта связывания ppGpp с холоферментом РНК-полимеразы *Escherichia coli*, «сайт 1» и «сайт 2», и установлено, что последний участвует в регуляции строгого ответа клетки на голодание на стадии инициации транскрипции. Исходя из имеющихся на тот момент структурных данных были предложены аминокислотные остатки, участвующие в связывании ppGpp. Однако проведенные нами замены этих аминокислотных остатков не привели к изменению чувствительности клеток к генотоксичным агентам.

Материалы и методы. Хромосомные мутанты E.coli с инактивированным сайтом связывания ppGpp в РНК-полимеразе были получены с помощью λ-Red рекомбинации для интеграции в хромосому донорной ДНК с мутациями и CRISPR/Cas9 системы для негативной селекции против клеток дикого типа. Полученные штаммы были протестированы на чувствительность к разным типам повреждений ДНК.

Результаты. В коллаборации с лабораторией Е.Нудлера с помощью криоэлектронной микроскопии была получена структура элонгационного комплекса РНК-полимеразы E.coli с ppGpp. Мы обнаружили, что ppGpp связывается с РНК-полимеразой в сайте 1, однако детали взаимодействия несколько отличаются от ранее установленных в структурах холофермента. Мы выделили три новых аминокислотных остатка в районе сайта 1, определяющих связывание сигнальной молекулы с РНК-полимеразой. Их замена на остатки аланина делает клетки *E.coli* чувствительными к мутагенам, как штамм с нарушенным синтезом ppGpp, но не влияет на развитие строгого ответа клеток на голодание.

Выводы. Установлена мишень ppGpp на РНК-полимеразе, которая определяет его роль в координации транскрипции и репарации ДНК.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований государственных академией наук (тема № 01201363822)

M3. Димерные ДНК-аптамеры к гемагглютинину вируса гриппа

Д.А. Бунин (bunin_dm@mail.ru)
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Химический факультет, Кафедра химии природных соединений.

Введение. Аптамеры — короткие одноцепочечные синтетические молекулы РНК или ДНК, способные высокоспецифично связываться с определенными мишенями. Так, например, в литературе [1] описаны удачные примеры аптамеров к гемагглютинину вируса гриппа (RHA0006 и RHA0385). В то же время, интересной представляется возможность сочетать несколько функциональных аптамерных модулей в одной

молекуле [2]. Целью данной работы является анализ связывания аптамеров с двумя функциональными модулями с гемагглютинином вируса гриппа.

Материалы и методы. Изучение аффинности аптамеров к гемагглютинину гриппа проводили при помощи метода интерферометрии биомолекул с использованием стрептавидиновых сенсоров, на которые иммобилизовали 5'-биотинилированные аптамеры и последовательно проводили ассоциацию иммобилизованного аптамера с вирусом и разрушение комплекса аптамер–вирус. В основе метода лежит явление интерференции между световой волной отраженной от поверхности сенсора и волной отраженной от слоя иммобилизованных молекул. После аппроксимации полученных данных

(в координатах «сдвиг интерференционного профиля–время») получали константы скорости ассоциации и диссоциации и рассчитывали кажущиеся константы диссоциации комплекса аптамера и вируса.

Результаты. Сопоставление кажущихся констант диссоциации комплекса вируса и аптамера показывает, что сочетание двух G-квадруплексных модулей, связанных ковалентным линкером в структуре аптамера RHA0006 является функционально значимым — удаление одного

G-квадруплекса из структуры RHA0006 приводит к почти двукратному снижению аффинности. Однако, добавление в структуру аптамера RHA0385 последовательностей нуклеотидов, способных к сборке нековалентных линкеров за счет комплементационных взаимодействий между двумя аптамерами RHA0385 не влияет на его аффинность к гемагглютинину гриппа.

Выводы. Аптамер RHA0006 — димер, в котором функциональную активность по отношению к гемагглютинину несут оба G-квадруплекса, связанных ковалентно. Модификация аптамера RHA0385 для сборки димеров практически не влияет на его аффинность к гемагглютинину гриппа.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда № 18-74-10019.

Список литературы.

1. I. Shiratori et al., Biochem. and Biophys. Res. Comm. 443, 37-41 (2014).
2. E. Zavyalova, A. Kopylov, Nanostructures for the Engineering of Cells, Chapter 7, William Andrew Publishing, 2018, 249-290.

M4. Клеточная модель для изучения динамики локусов MYC и IGH в живой клетке

В.С. Вьюшков (vyushkov22@gmail.com)[1,2], Н.А. Ломов[1,2], Е.С. Васецкий[2,4], М.А. Рубцов[1,2,3]

[1]Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

[2]Международная ассоциированная лаборатория LIA LFR2O "Laboratoire franco-russe de recherches en oncologie", Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва - Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

[3]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Россия, Москва

[4]UMR 8126, Université Paris-Sud Paris-Saclay, CNRS, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Введение. Инфекция вирусом иммунодефицита человека сопряжена с повышенной вероятностью развития злокачественных новообразований, в частности лимфомы

Беркитта. В большинстве случаев такой лимфомы в опухолевых клетках обнаруживается хромосомная транслокация t(8;14), соединяющая локусы MYC и IGH. Недавно с помощью метода FISH было показано, что белок tat ВИЧ вызывает перемещение локуса MYC к локусу IGH в ядре и последующее формирование транслокации [1]. Тем не менее, до сих пор не исследовалась динамика локусов MYC и IGH и формирование транслокации в живой клетке. Проведение такого исследования и стало целью нашей работы. Для этого необходимо создать клеточную модель, содержащую систему для прижизненного наблюдения за участками генома. В качестве такой системы была выбрана система ANCHOR [2].

Материалы и методы. Были подобраны гидовые РНК для нуклеазы Cas9 для интеграции элементов системы ANCHOR в локусы MYC и IGH. Проверка гидовых РНК осуществлялась методом ENIT [3]. Методами молекулярного клонирования была получена плазмида, содержащая ген белка OR1-GFP и последовательность ANCH1, фланкированные плечами гомологии к гену *MYC*. Полученная плазмида трансфицировалась в клетки линии LCL совместно с плазмидами гидовой РНК к гену MYC и нуклеазы Cas9.

Результаты. Спустя две недели после трансфекции GFP-положительные клетки были отобраны на клеточном сортере. При конфокальной микроскопии отобранных клеток в ядрах были обнаружены фокусы GFP. Интеграция системы ANCHOR в ген *MYC* была подтверждена с помощью ПЦР.

Выводы. Мы получили клеточную линию, с помощью которой можно изучать расположение и подвижность локуса MYC в ядре. Полученная линия будет в дальнейшем использована для интеграции ANCHOR системы в локус IGH и для изучения влияния tat белка ВИЧ на образование транслокации MYC-IGH.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 19-54-16002_НЦНИЛ_а и 19-04-00531_А.

Список литературы.

1. D. Germini et al., Leukemia. 31(11), 2515–2522 (2017).
2. H. Saad et al., PLoS Genet. 10(3), e1004187 (2014).
3. D. Germini et al., Mol. Ther. - Methods Clin. Dev. 5, 43–50 (2017).

M5. Различия в метаболизме родаминовых красителей в нормальных и опухолевых клетках

Е.А. Демченко (demchenko.jane@mail.ru)[1], Л.Д. Зорова[2]

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра молекулярной биологии, Россия, Москва

[2]Научно-исследовательский институт Физико-Химической Биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Россия, Москва

Введение. Родамин 123 – флуоресцентный зонд, широко используемый для оценки значений митохондриального мембранного потенциала [1]. Механизм накопления и удержания красителя в разных типах клеток недостаточно изучен, однако имеются данные о различном удержании зонда опухолевыми и здоровыми клетками [2]. Целью данной работы является сравнение процессов накопления, удержания и метаболизма родамина 123 в клетках астроцитов и глиомы.

Материалы и методы. Клетки астроцитов и глиомы C6 инкубировали с родамином 123 (2 uM) в течение 2 часов. Бутанольный клеточный экстракт (методика согласно

[3]) анализировали методами ТСХ и масс-спектрометрии для определения продуктов метаболизма красителя. Для оценки зависимости удержания зонда от уровня мембранного потенциала к клеткам после их инкубации с исходным зондом добавляли разобщитель СССР. Результаты регистрировали на флоуресцентном микроскопе Axio Vert.A1. Для оценки возможного участия цитохрома P450 в метаболизме красителей клетки инкубировали одновременно с родамином 123 и ингибитором фермента амиодароном (2 uM). Результаты оценивались с использованием проточной цитофлуориметрии и статистически обрабатывались в Flowing Software.

Результаты. Обнаружены различия в метаболизме родамина 123 в астроцитах и клетках глиомы. В частности, в клетках глиомы зарегистрировано наличие производных родамина 123, в том числе с большей молекулярной массой чем у исходного красителя. Реакция культур на добавление СССР также отличалась. Флуоресценция родаминового зонда полностью исчезала через несколько часов после добавления СССР к астроцитам, тогда как в клетках глиомы она сохранялась спстя 24 часа. После инкубации с амиодароном была зарегистрирована более интенсивная флуоресценция в обеих культурах, однако эффект был значительно более выражен в астроцитах.

Выводы. Различия в метаболизме родамина 123 в клетках глиомы и астроцитах заключаются в модификации за счет присоединения химических групп к родамину 123 в клетках глиомы и, возможно, в более высоком уровне активности эстераз в клетках глиомы. Предположительно, активность цитохрома P450, участвующего в метаболизме родамина 123, в двух типах клеток различна.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований № 18-04-01034.

Список литературы.

1. Л.Д.Зорова и соавт., Биологические мембраны. 34, 6, 93-100 (2018).
2. I. C. Summerhayes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79, 5292-5296 (1982).
3. K. K. Nadakavukaren et al., Cancer research. 45, 6093-6099 (1985).

M6. Роль TNFR2 сигнального пути в поддержании гомеостаза B-клеток

А.П Дыгай (dygayarina@gmail.com)[1,2], В.С. Гоголева[1]
[1]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

Введение. Фактор некроза опухоли (TNF) – цитокин, играющий важную роль в иммунной регуляции и воспалении. Передача сигнала через TNFR2, одного из двух рецепторов TNF, необходима для поддержания гомеостаза различных популяций иммунных клеток. Так, ранее было показано, что TNFR2 важен для функционирования Т-регуляторных клеток [1]. Однако его роль в развитии и функционировании В-клеток остаётся плохо изучена [2-4]. Целью данной работы является исследование роли TNF-TNFR2 сигнального пути в поддержании гомеостаза различных популяций В-клеток.

Материалы и методы. Работу проводили на мышах дикого типа C57BL/6, гуманизированных по TNF (hTNFKI) и дважды гуманизированных по TNF и TNFR2 (hTNFKI x hTNFR2KI) мышах. У мышей оценивали уровень экспрессии генов, участвующих в развитии и поддержании В-клеток, в костном мозге, селезенке и тимусе методом

ПЦР в реальном времени. Далее проводили анализ различных популяций В-клеток в селезенке и тимусе методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. У hTNFKI мышей, характеризующихся нарушением сигнального пути TNF-TNFR2 [1], в гомеостазе наблюдалось накопление B2 фолликулярных клеток с фенотипом CD19+B220+CD21-CD23+IgD+ в тимусе. При этом нарушение TNFR2 сигнального пути не влияло на состав и количественное содержание фолликулярных В-клеток и В-клеток маргинальной зоны в селезёнке. Анализ экспрессии генов, ассоциированных с развитием, активацией, поддержанием эффекторных и регуляторных функций В-клеток в костном мозге, селезёнке и тимусе не выявил различий между экспериментальными группами. Анализ экспрессии генов, отвечающих за миграцию В-клеток, показал, что в тимусе наивных hTNFKI мышей происходит увеличение экспрессии CXCL13, важного хемокина, принимающего активное участие в формировании В-клеточных фолликул.

Выводы. Нарушение TNFR2 сигнального пути приводит к накоплению B2 фолликулярных клеток в тимусе мышей, которое коррелирует с повышенной экспрессией CXCL13.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда №19-75-30032.

Список литературы.

1. K. N. Atretkhany et al., Proc Natl Acad Sci U S A 115(51): 13051-13056 (2018).
2. W. Hoffman et al., Clin J Am Soc Nephrol 11(1): 137-154 (2016).
3. L. K. Ward-Kavanagh et al., Immunity 44 (5): 1005-1019 (2016).
4. O. Ticha et al., Front Immunol 8: 1951 (2017).

M7. Дифференцировочный потенциал иммортализованных клеточных линий снижен в сравнении с первичными культурами клеток человека

А.А. Картошкин (ant-kar-123@yandex.ru), Н.С. Волошин, Д.К. Мартынов, К.Ю. Кулебякин
МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва.

Введение. В настоящее время наметился тренд на использование первичных клеток человека, иммортализованных при помощи теломеразы (TERT), как моделей для изучения функции соответствующих тканей. Иммортализованные клеточные линии являются удобным объектом, занимая промежуточное положение между трансформированными линиями и первичным материалом. Ранее было показано, что иммортализованные линии МСК демонстрируют нарушенную гормональную чувствительность [1]. В данной работе мы сравнили дифференцировочный потенциал иммортализованных клеток и первичных МСК в классических для этих клеток направлениях — адипогенном и остеогенном.

Материалы и методы. В нашей работе использовались иммортализованные МСК линии ASC52telo (ATCC SCRC-4000TM), а также первичные МСК, полученные от здоровых доноров. Индукцию адипогенной дифференцировки осуществляли при помощи набора Chemicon Mesenchymal Adipogenesis Kit (Merk), или при помощи

10 μg/mL инсулина, 0.5 mM IBMX и 1 μM дексаметазона. Индукцию остеогенной дифференцировки осуществляли при помощи набора StemProTM Osteogenesis Differentiation Kit (Thermo), или при помощи 0.1 μM дексаметазона, 0.2 mM аскорби-

новой кислоты и 10 mM глицерол-2-фосфата. Для оценки дифференцировки клеток использовали гистохимическое окрашивание с помощью Oil Red O или ализаринового красного. Дифференцировка оценивалась методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией по экспрессии ключевых маркеров дифференцировки.

Результаты. Гистологическое окрашивание и ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией выявили значимые отличия в дифференцировке клеток линии ASC52telo по сравнению с первичными МСК, полученными от здоровых доноров. Продемонстрированы значительные морфологические отличия при окрашивании тканеспецифичными красителями, а также различия в профиле экспрессии основных маркеров адипогенной и остеогенной дифференцировки.

Выводы. Иммортализованные МСК сохраняют принципиальную способность к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлении, однако эффективность дифференцировки данных клеток снижена по сравнению с первичной культурой клеток, полученной от донора.

Список литературы.

1. Tyurin-Kuzmin, Pyotr, et al., Int J Mol Sci. 19(12), 3712 (2018).

M8. Сравнительная динамика канонических нуклеосом и нуклеосом с вариантной формой гистона H2A

А.С. Князева (a.kniazeva@intbio.org), Г.А. Армеев, А.К. Шайтан

Московский Государственный университет им. М.В.Ломоносова, Биологический ф-т, каф. Биоинженерии, Россия, Москва, 119991, Ленинские горы, д. 1, стр. 73

Введение. Реализация генетической информации, представленной в форме хроматина, и ее регуляция зависит от динамических свойств нуклеосом и канонических/вариантных форм гистонов, формирующих нуклеосому. Одним из универсальных для эукариот вариантом гистона H2A является гистон H2A.Z. В клетке замену канонического димера H2A-H2B на димер с вариантной формой осуществляет ремоделирующий комплекс из семейства INO80. На данный момент остается неизвестным, какие именно динамические особенности димеров являются ключевым отличием при узнавании ремоделером и при выполнении специфических функций.

Материалы и методы. В данной работе были проведены расчеты траекторий методом молекулярной динамики комплексов ДНК и гистонов. Получены траектории длиной порядка 3 мкс. Проведено сравнение динамических характеристик димеров в окружении 30 пн ДНК и полноразмерных нуклеосом, несущих в составе канонические H2A, замещенные по одной или двум позициям (в соответствии с вариантом H2A.Z) H2A и вариантные H2A.Z. Для построения систем использовались кристаллические структуры нуклеосом (PBD IDs: *1KX5, 3LZ0, 1F66*).

Результаты. При сравнении динамики полных нуклеосом с каноническим H2A и вариантом H2A.Z было показано усиление динамики ДНК и интенсивное движение отворачивания в системе с вариантной формой. Аналогичный эффект был обнаружен в системах димер-ДНК при внесении одной замены в положении H2A47 (замена Gly на Lys) и системе с двумя заменами в положениях H2A47 (Gly на Lys) и H2A49 (Pro на Ala) (данные позиции, согласно экспериментальным данным, являются критическими при узнавании ремоделером).

Выводы. Показан эффект дестабилизации сайтов связывания ДНК в системах с замещенными H2A и вариантном H2A.Z. Также показаны отличия в пластичности элементов гистонового фолда систем, что, вероятно, определяет устойчивость сайтов взаимодействия гистонов с ДНК.

Работа поддержана грантом РНФ № 18-74-10006. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

M9. Влияние уровня поли(АДФ-рибоза)полимеразы 1 на статус системы эксцизионной репарации оснований ДНК в клетках HEK-293T

А.С. Кочеткова (kochetkovaalina96@gmail.com)[1,2], М.М. Кутузов[1,2], С.Н. Ходырева[1,2], Е.С. Ильина[2]

[1]Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

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

Введение. Поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 (PARP1) – важный регуляторный белок системы эксцизионной репарации оснований (BER), выполняющий функцию «сенсора» повреждений ДНК. Участие PARP1 в BER повышает эффективность и ускоряет процесс репарации. Целью работы являлось изучение зависимости экспрессии генов, кодирующих ряд ключевых белков BER от экспрессии гена PARP1, а также сравнение эффективности функционирования этих ферментов на различных стадиях BER в экстрактах контрольной линии и линии со сниженным содержанием PARP1.

Материалы и методы. Из клеток HEK-293T и HEK-293T-P1SH (со сниженным содержанием PARP1), выделяли тотальную РНК и цельноклеточные белковые экстракты. Методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени оценивалось изменение уровня экспрессии генов, кодирующих белки-участники BER, в клеточной линии HEK-293T-P1SH в сравнении с HEK-293T. Эффективность работы ферментов в клеточных экстрактах определялась с помощью функциональных тестов с использованием 32P-меченых ДНК-дуплексов, моделирующих различные повреждения.

Результаты. По результатам ОТ-ПЦР в режиме реального времени для ряда генов были получены значения уровня экспрессии в клетках обеих линий. Белковые экстракты были проверены на эффективность поли(ADP-рибозил)ирования, удаления урацила, процессинга апуринового/апиримидинового (AP-) сайта и элонгации цепи ДНК-полимеразами.

Выводы. Снижение в 2 раза содержания PARP1 в клеточной линии HEK-293T-P1SH в сравнение с контрольной линией не привело к значимым изменениям в работе BER. Эффективность удаления урацила из цепи ДНК и расщепление AP-сайта белками экстрактов HEK-293T-P1SH снижено в пределах 5-10% относительно экстрактов HEK-293T; ДНК-полимеразная активность в HEK-293T-P1SH, наоборот, оказалась выше, чем у контрольной линии на 10%. Количественная оценка экспрессии генов с помощью ОТ-ПЦР показала, что уровень мРНК генов белков-участников BER в обеих клеточных линиях меняется незначительно, за исключением самого PAPR1.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-00-00097.

M10. Использование омиксных технологий для исследования свойств мезенхимальных стромальных клеток костного мозга при диффузной В-крупноклеточной лимфоме

И.К.Мальянц (iricat@mail.ru)[1,3], П.В.Шнайдер[1], К.С.Ануфриева[1,2], Г.П.Арапиди[1,2], В.О.Шендер[1,2]
[1]ФГБУ ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА
[2]ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
[3]ФГБОУ РХТУ им. Д.И.Менделеевая

В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ) является наиболее распространенным типом лимфом, быстро прогрессирует и характеризуется высокой летальностью. Известно, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) костного мозга являются важными участниками опухолевого микроокружения и стимулируют прогрессию злокачественных новообразований [1], [2]. Целью данной работы является исследование вклада опухолевого процесса и химиотерапии в изменение функций ММСК при отсутствии непосредственного контакта с опухолевыми клетками при ДВКЛ с использованием омиксных технологий.

Материалы и методы. Забор костного мозга производился от одних и тех же пациентов с ДВКЛ до и после химиотерапии (n=6) и от здоровых доноров (n=5). После чего с применением стандартного протокола [2] из костного мозга выделяли ММСК. Для исследования дифференциальной экспрессии генов ММСК производили полнотранскриптомное профилирование поли-А фракции РНК на платформе Illumina. Для исследования профилей секреции ММСК был проведен LC-MS/MS анализ на приборе Orbitrap Q Exactive HF.

Результаты. В результате сравнительного анализа секретомов выявлено, что ММСК первичных пациентов по сравнению с ММСК здоровых доноров секретируют белки, отвечающие, в основном, за активацию процессов, связанных с иммунным ответом, цитокиновым сигналингом и пролиферацией мезенхимальных стволовых клеток. Важно отметить, что изменений в профилях секреции ММСК пациентов до и после лечения выявлено значительно меньше по сравнению с ММСК здоровых доноров, эти изменения связаны с процессами регенерации и ответа на повреждение и стресс. На уровне транскриптома у пациентов с лимфомой по сравнению со здоровыми донорами также преимущественно повышена представленность генов, связанных с иммунной системой и цитокиновым сигналингом.

Выводы. Мы предполагаем, что больший вклад в изменение профилей секреции ММСК вносят раковые клетки, а не воздействие химиотерапии.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-00-00172.

Список литературы.

1. Jiang Y. et al., Int. J. Mol. Sci. 20, 2566 (2019).
2. Poon Z. et al., Leukemia. 33, 1487-1500 (2018).
3. E. A. Fastova et al., Bull Exp Biol Med. 167, 150-153 (2018).

M11. Установление механизмов регуляции остеогенной дифференцировки стволовых клеток компонентами внеклеточного матрикса, продуцируемыми мезенхимными стромальными клетками

И.Г. Миловская (irina.20152016@mail.ru), Е.С. Новоселецкая, К.Ю. Кулебякин, А.Ю. Ефименко
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Мультипотентные мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) способны дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях [1]. МСК располагаются в специализированном окружении, называемом нишей, важнейшей составляющей которого является внеклеточный матрикс (ВКМ). ВКМ обладает инструктирующим потенциалом в отношении судьбы МСК [2]. Целью работы являлось установление механизмов регуляторного воздействия ВКМ на дифференцировку МСК в остеогенном направлении.

Материалы и методы. МСК, культивировали на разных типах подложек, которые представляли собой различный по составу ВКМ. Нативный ВКМ (дВКМ) получали от клеток разных типов (иммортализованные МСК жировой ткани (hTERT-МСК), дермальные фибробласты). В качестве контрольной подложки использовали культуральный пластик. Наличие дифференцировки оценивали по гистологической окраске и изменению экспрессии маркеров дифференцировки с помощью ПЦР. Различия в уровнях экспрессии основных участников сигнальных каскадов оценивали с помощью вестерн-блоттинга.

Результаты. Показано, что первичные МСК, культивируемые на дВКМ от hTERT-МСК, медленно пролиферируют, но значительно быстрее дифференцируются в остеогенном направлении после индукции. Результаты вестерн-блоттинга демонстрируют различие в уровнях экспрессии протеинкиназы ERK: в МСК, культивируемых на дВКМ от hTERT-МСК, уровень ниже по сравнению с МСК контрольных подложкек. Активации сигнального пути FAK в МСК, культивируемых на разных подложках, не наблюдали.

Выводы. дВКМ, продуцируемый hTERT-МСК, сдерживает пролиферацию МСК, что проявляется в снижении активности MAPK-ERK сигнального пути. Это позволяет предполагать, что дВКМ от hTERT-МСК, как модель матриксного компонента нативной ниши стволовых клеток, поддерживает МСК в состоянии готовности к дифференцировке и обеспечивает быстрый ответ клеток на дифференцировочные стимулы. Необходимы дальнейшие исследования для анализа взаимосвязей между дифференцировочным потенциалом МСК и ВКМ, продуцируемым клетками.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант №19-75-30007) и РФФИ (грант № 19-315-90060).

Список литературы.

1. C. M. Kolf, E. Cho, R. S. Tuan, Arthritis Research & Therapy. 9, 1–10 (2007).
2. F. Gattazzo, A.Urciuolo, P.Bonaldo, Biochim Biophys Acta. 1840, 2506–2519 (2014).

M12. Организация сигнального пути TGF-beta и его активность в развитии губки *Halisarca dujardini*

А.Л. Подлевских (ann-vesta201395@yandex.ru), И.Е. Борисенко
Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Сигнальный путь TGF-β – один из основных путей межклеточной коммуникации, участвующий в становлении полярности зародышей всех *Metazoa*. Целью исследования является изучение организации сигнального пути TGF-β и его активности в развитии губки *Halisarca dujardini* (*Demospongia*).

Материалы и методы. Ранее нами были определены последовательности ортологов генов, кодирующих лиганды (8 молекул), рецепторы (6 молекул) и Smad-белки (6 молекул), участвующие в TGF-β-сигналинге, синтезированы зонды для гибридизации *in situ* для семи лигандов. Был проведен филогенетический анализ лигандов. Материал для исследования был собран на Белом море кошкованием, отбирались и фиксировались особи, в которых были найдены зародыши. С помощью окраски на ДНК DAPI и конфокальной микроскопии определены стадии развития эмбрионов. Была проведена РНК-гибридизация *in situ* с зондами к лигандам на фрагментах тела губки с зародышами. Для более детального изучения экспрессии были произведены заливка в акриловую смолу и изготовление срезов толщиной 5-7 мкм на ультратоме.

Результаты. Из восьми лигандов пять сформировали хорошо поддержанную группу в основании филогенетического дерева, а три были отнесены к TGF-β *sensu stricto*. Гибридизация *in situ* с 7 ортологами лигандов показывает, что некоторые из них экспрессируются диффузно во всем зародыше, некоторые (на стадии формирования предличинки) демонстрируют более интенсивную экспрессию в наружном клеточном слое, некоторые также экспрессируются в клетках эмбриональной капсулы. Один из лигандов не показал экспрессии в зародышах.

Выводы. Гены, кодирующие лиганды TGF-β, не обнаружили локальной экспрессии по апикобазальной оси губки. В дальнейшем планируется выявление паттерна экспрессии генов, кодирующих рецепторы TGF-β, и локализация активных (фосфорилированных) форм Smad-белков методами непрямой иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии для формирования более целостной картины организации сигнального пути TGF-β у *H. dujardini*.

Проект выполняется при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-00398, с использованием оборудования РЦ РМиКТ СПбГУ.

M13. Исследование роли MTS1338, малой РНК *Mycobacterium tuberculosis*, во взаимодействии внутриклеточного патогена с клеткой хозяина

Д.М. Потанина (potanina.dasha@ya.ru)[1], А.С. Григоров[2], Ю.В. Скворцова[2], Т.Л. Ажикина[2]

[1]Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, Москва

[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Введение. Туберкулез является одним из самых распространенных заболеваний человека, в частности, из-за способности возбудителя *M. tuberculosis* — существовать в дормантном состоянии. В данной работе изучалась одна из задействованных в этом

малых РНК MTS1338, накапливающаяся в микобактериях в стационарной фазе роста под действием NO-стресса и гипоксии. Мы предполагаем, что MTS1338 может не только регулировать экспрессию генов и метаболизм *M. tuberculosis* в условиях макрофагального стресса, но и секретироваться в клетку хозяина и интерферировать с его сигнальными путями.

Материалы и методы. Для проверки этого предположения мы показали, что экзогенная экспрессия MTS1338 способствует увеличению времени жизни непатогенной бактерии *Mycobacterium smegmatis* внутри макрофагов THP-1, а также с помощью PR-qPCR подтвердили наличие этой малой РНК в цитоплазме зараженной клетки хозяина. Также для обнаружения возможных путей интерференции MTS1338 с сигнальными путями макрофага было проведено секвенирование библиотек коротких РНК из цитоплазмы макрофагов, зараженных M. smegmatis, экспрессирующим MTS1338.

Результаты. Основным результатом работы стало выявление группы макрофагальных микроРНК, уровень экспрессии которых изменяется в инфицированных макрофагах при экспрессии MTS1338. Наиболее интересным оказалось снижение количества транскриптов микроРНК hsa-miR-3182, экспрессия которой связана с модулированием иммунных путей макрофагов при инфекции.

Выводы. Мы продемонстрировали регуляторную роль малой РНК *M. Tuberculosis* MTS1338 в адаптации микобактерий к персистированию внутри макрофагов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 18-15-00332

M14. Роль повторов мотива EBS в регуляции EIN3-зависимого ответа на этилен у *Arabidopsis thaliana L.*

Е.М. Пуховая (e.pukhovaya@gmail.com)[1,2], В.А. Долгих[2], Е.В. Землянская[1,2]
[1]Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск
[2]Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. Траскрипционный фактор (ТФ) EIN3 - главный регулятор ответа растений на фитогормон этилен. EIN3 связывает в промоторах последовательность, называемую EBS, с консенсусом A(T/C)G(A/T)A(C/T)CT. Однако, точный механизм активации генов посредством EIN3 неизвестен. Поскольку EIN3 функционирует в составе димера, мы исследовали роль повторов EBS различной структуры в регуляции транскрипционного ответа на этилен *in silico*.

Материалы и методы. de novo поиск обогащенных мотивов в пиках ChIP-seq по связыванию EIN3 в геноме *Arabidopsis thaliana* из доступных данных [1] осуществляли с помощью программы Homer [2], анализ представленности повторов EBS различной структуры – с помощью программы MCOT [3]. Распознавание повторов EBS в промоторах осуществляли с помощью позиционно-весовых матриц.

Результаты. В пиках ChIP-seq по связыванию EIN3 обогащены несколько вариантов инвертированных повторов EBS. Один из повторов сходен с сайтом связывания ТФ FUS3, не родственного EIN3. Анализ взаимного расположения этого повтора и сайта связывания FUS3 в пиках позволил предположить, что FUS3 и EIN3 могут конкурировать за связывание с ДНК или связываться с ней кооперативно. Мы распознали соответствующий повтор EBS в промоторах 111 генов-мишеней EIN3. Для уточнения роли EIN3 и FUS3 в их регуляции планируется экспериментальное изучение экспрессии выборки генов.

Выводы. Инвертированные повторы EBS могут играть важную роль в регуляции ответа на этилен. Некоторые варианты повторов могут обеспечивать взаимодействия с ТФ, участвующими в регуляции других сигнальных путей.

Работа частично поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований, грант № 18-29-13040.

Список литературы.

1. Chang, K. et al., Elife 1–20 (2013).
2. Heinz, S., et al., Mol. Cell 38, 576–89 (2010).
3. Levitsky, V., et al., Nucleic Acids Res. 47, 139 (2019).

M15. Разработка методов изучения роли белков когезинового комплекса в регуляции сегрегации хроматид в интерфазе

Е.Д. Рюмина (ryu-ekaterina@yandex.ru)[1,3], С.Ю. Сосновская (sophie2811@mail.ru)[2,3]
[1]факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ
[2]кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ
[3]НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского

Введение. Когезин — это мультибелковый комплекс, включающий белки Smc, участвующий в установлении когезии сестринских хроматид, пространственной организации, сегрегации генома, регуляции экспрессии генов и репарации двуцепочечных разрывов ДНК. В привлечении когезина к ДНК участвует комплекс Nipbl/Mau2 [1], диссоциации когезина способствует белок Wapl [2]. Мутации по этим белкам приводят в том числе к когезинопатиям (например, синдрому Корнелии де Ланге [3]). В данной работе разрабатываются методы изучения влияния мутаций Nipbl, Smc3, Wapl на пространственную организацию хроматина в интерфазе.

Материалы и методы. Репликативное мечение хроматина с визуализацией при помощи click-химии, иммунофлуоресцентная микроскопия суперразрешения (SIM, STORM), иммуноэлектронная и корреляционная микроскопия (CLEM), электронная томография, обработка и анализ изображений при помощи алгоритмов машинного обучения (ML).

Результаты. Разработана процедура обработки данных с использованием ML для разделения клеток по репликативным паттернам и нахождения параметров отличий клеток дикого типа от мутантных на уровне разрешения SIM. Адаптирован метод CLEM.

Выводы:

1. Автоматизированная обработка изображений может быть использована для поиска различий в репликативных паттернах клеток дикого и мутантного типов.

2. Найденные отличия в гранулярности, распределении интенсивности репликативной метки и числе меченых нуклеотидов в составе одного репликативного локуса говорят о различной плотности упаковки ДНК.

3. Модифицированная CLEM может быть использована для получения изображений репликативных локусов на уровне разрешения STORM и электронной микроскопии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-015-00273, IFOM (Милан, Италия) и Университета Ренна (Ренн, Франция).

Список литературы.

1. Carretero M., et al. Curr Opin Cell Biol, 2010.22(6):p.781-7.
2. Gandhi R., et al Curr Biol, 2006.16(24):p.2406-2417.
3. Liu J., et al. Clin Genet, 2009.76(4):p.303-14.

M16. Клеточные характеристики формирования регенеративной мембраны у известковой губки *Leucosolenia cf. variabilis*

К.В. Скоренцева (skorentseva.ksenya.2016@post.bio.msu.ru)[1], А.И. Лавров[2,3], А.А. Саидова[1],

[1]Кафедра клеточной биологии и гистологии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

[2]Беломорская Биологическая станция им. Н.А. Перцова, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

[3]Кафедра эмбриологии, Биологический факультет, Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Представители типа Porifera являют собой группу наиболее древних из ныне живущих многоклеточных. Уникальное гистологическое строение губок и их выдающиеся способности к клеточным миграциям, трансдифференцировкам, а также регенерации, обуславливает давний интерес учёных к этим животным. Целью данного исследования стало описание особенностей процесса регенерации оскулярной трубки у губки *Leucosolenia cf. variabilis*.

Материалы и методы. Оскулярную трубку взрослой губки разрезали на кольца шириной 2-4 мм и содержали в фильтрованной морской воде до образования регенеративной мембраны [1]. Образцы с мембраной зафиксировали для изучения при помощи СЭМ согласно опубликованным протоколам [2]. Было проведено иммуноцитохимическое окрашивание с последующим изучением препаратов на конфокальном микроскопе. Процесс регенерации был зафиксирован при помощи цейтраферной съёмки, использование EdU-метки позволило оценить пролиферативный потенциал интактных и прилегающих к ране тканей [2].

Результаты. В регенеративной мембране на всех этапах формирования можно выделить три слоя клеток. Это уплощённые полигональные экзопинакоциты, различные по поведению и функциям клетки мезохила и эндопинакоциты, появляющиеся в процессе постепенной трансдифференцировки хоаноцитов. Последние при этом утрачивают воротничок микроворсинок и жгутик. Иммуноцитохимическое окрашивание позволило проиллюстрировать структуры актинового цитоскелета и промежуточные филаменты в клетках животного и показать наличие межклеточных контактов. На основе полученных видеоматериалов были описаны стадии клеточных преобразований в процессе регенерации.

Выводы. Формирование регенеративной мембраны идёт за счёт миграции клеток и образования межклеточных контактов в месте повреждения, существенного увеличения количества пролиферирующих клеток не происходит. Процесс базируется на перемещении и трансдифференцировке существующих клеток. Можно говорить о регенерации путём морфаллаксиса, происходящего за счёт эпителиальных морфогенезов.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда № 17-14-01089 и Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 19-04-00563.

Список литературы.

1. Г.П. Короткова, Вест. ЛГУ, 1963, №3, с. 34–47.
2. A.I. Lavrov et al., Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmen-tal Evolution. 1–21 (2018).

M17. Анализ изменения экспрессии генов при действии уабаина в культуре нейронов, полученных из ИПСК человека

Ю.А. Тимошина (july.timoschina@yandex.ru)[1,2], Р.Б. Казанская[3], А.В. Лопачев[1,2], М.А. Лагарькова[4], М.Д. Логачева[5], Р.Р. Гайнетдинов[6], Т.Н. Федорова[1]

[1]Научный центр неврологии, Россия, Москва

[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

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

[4]НИИ физико-химической медицины, Россия, Москва

[5]Сколковский институт науки и технологий, Россия, Москва;

[6]Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный универ-ситет, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Na,K-АТФаза участвует в регуляции многих физиологических процессов в ЦНС. Нарушение работы специфической для нейронов α3 субъединицы Na,K-АТФазы связано с развитием неврологических заболеваний. Кардиотонические стероиды были обнаружены в организме млекопитающих и могут быть эндогенными регуляторами в ЦНС. Целью исследования было выявление групп генов, экспрессия которых изменяется при воздействии уабаина на культуру нейронов, полученных из ИПСК человека.

Материалы и методы. Культуру нейронов получали из ИПСК человека по ранее отработанному протоколу. Оценку экспрессии нейрональных маркеров в культуре проводили при помощи иммуноцитохимического окрашивания антителами к β3 тубулину, MAP2, DARP32, тирозингидроксилазе, GFAP. Оценку токсичности уабаина проводили после 48 ч инкубации при помощи МТТ-теста и измерения активности ЛДГ в среде. Полный анализ экспрессии генов был проведен при помощи технологии RNAseq с последующей кластеризацией и распределением генов по GO группам.

Результаты. Полученные культуры нейронов экспрессируют β3 тубулин, MAP2, DARP32. При инкубации в течение 48 ч уабаин в концентрации от 100 нМ уменьшал жизнеспособность культуры, в концентрации от 10 нМ увеличивалась активность ЛДГ в среде. Инкубация культуры с 10 нМ уабаином в течение 16 часов вызывала увеличение экспрессии групп генов связанных с: дофаминергическим синапсом, циркадными ритмами, окислительным фосфорилированием, регуляцией активности MAP-киназ, RAS-зависимыми сигнальными каскадами, HIF-1-связанными сигнальными каскадами, и TGF- бета зависимыми сигнальными каскадами, различными патологиями: болезнь Гентингтона, болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера. Уменьшилась экспрессия групп генов, связанных с развитием ЦНС, а также развитии кокаиновой зависимости и болезни Паркинсона.

Выводы. Данное исследование выявило широкий спектр процессов в нейронах характерных как для нормальной, так и патологической физиологии ЦНС вызываемых уабаином.

M18. Уабаин и маринобуфагенин: возможные физиологические эффекты на клетки эпителия и эндотелия человека

Д.А. Федоров (fedorovdmitry42@gmail.com), Е.А. Климанова, С.В. Сидоренко, П.А. Абрамичева, О.Д. Лопина, С.Н. Орлов

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Россия

Введение. Кардиотонические стероиды (КТС), являющиеся специфическими ингибиторами Na,K-АТРазы [1], широко используются в науке и медицине. Недавно некоторые представители данного семейства, в том числе уабаин и маринобуфагенин, были обнаружены в плазме крови. Также есть данные о том, что эти соединения могут быть вовлечены в развитие гипертонической болезни [2]. Целью данной работы является изучение влияния различных концентраций уабаина и маринобуфагенина на функционирование клеток почечного эпителия (HREC) и эндотелия человека (HUVEC).

Материалы и методы. Первичную культуру клеток HREC и HUVEC 4-8-го пассажа обрабатывали уабаином и маринобуфагенином в концентрациях 0,1 нМ - 3 мкМ на протяжении 3 - 30 часов. Затем оценивали транспорт Na^+, K^+ и Rb^+ в клетках методами жидкостной сцинтилляции и атомно-абсорбционной спектрометрии. Жизнеспособность клеток определяли по степени их открепления от подложки, расщеплению хроматина и активности каспазы-3. Статистическую обработку проводили с использованием адаптаций пакета ggplot2.

Результаты. При физиологических концентрациях (<10 нМ) уабаин не влиял на ионные потоки клеток HREC, но активировал синтез ДНК. При воздействии на HUVEC субнаномолярные концентрации уабаина вызывали уменьшение $[Na^+]/[K^+]$ соотношения в клетках и активацию синтеза ДНК. Обработка более высокими концентрациями уабаина приводила к увеличению $[Na^+]/[K^+]$ соотношения в клетках HREC и HUVEC, а также к гибели этих клеток. Физиологические концентрации маринобуфагенина (<10 нМ) не оказывали влияния на ионный состав обоих типов клеток и их жизнеспособность. При концентрациях выше 100 нМ данный КТС увеличивал $[Na^+]/[K^+]$ соотношение в клетках HREC и HUVEC, но не приводил к цитотоксическому эффекту.

Выводы. Таким образом, эндогенные КТС, являющиеся гормонами, могут оказывать различные эффекты на разные типы клеток.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований № 18-34-00344.

Список литературы.

1. Skou, J. Chr, Biochim. Biophys. Acta. 42, 6–23. (1960).
2. Khalaf et al., Int. J. Mol. Sci. 19 (2018)

M19. Белок Non3 (Novel Nucleolar protein 3) необходим для формирования прицентромерного гетерохроматина *Drosophila melanogaster*

А.А. Юшкова (a.yushkova@g.nsu.ru)[1,2], Е.Н. Андреева[2], А.А. Огиенко[2], Ю.В. Попова[2], А.В. Пиндюрин[1,2]
[1]Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск
[2]Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. Ядрышко играет ключевую роль в биогенезе рибосом, но некоторые белки ядрышка также участвуют и в других клеточных процессах. Показано, что снижение количества ядрышкового белка Non3 в культивируемых клетках S2 дрозофилы влияет на формирование веретена деления [1]. Известно, что дефекты сборки митотического веретена деления ассоциированы с нарушением формирования прицентромерного гетерохроматина [2]. Целью работы является исследование роли консервативного белка Non3 в формировании прицентромерного гетерохроматина *Drosophila melanogaster*.

Материалы и методы. Методом неточной эксцизии P-элемента были получены четыре мутации по гену *Non3*. Посредством комплементационного анализа этих мутаций был сформирован аллельный ряд, включающий в себя как жизнеспособные аллели, так и рецессивные ранние летали. Создана система для индуцируемой наработки рекомбинантных белков Non3-eGFP и eGFP-Non3 в тканях дрозофилы. Проведена оценка частоты мейотической рекомбинации в прицентромерных районах хромосом и анализ влияния мутаций по гену Non3 на проявление эффекта положения мозаичного типа в линии $In(1)^{wm4h}$.

Результаты. Мы показали, что мутации по гену *Non3* приводят к снижению связывания белка HP1 в прицентромерном гетерохроматине, вследствие уменьшения уровня ди- и три- метилирования гистона H3K9. Полученные рекомбинантные белки Non3-eGFP и eGFP-Non3 в клетках слюнных желез локализуются в ядрышке. Мы продемонстрировали, что мутации по гену *Non3* подавляют инактивацию гена *white* в модели $In(1)^{wm4h}$ и повышают частоту мейотической рекомбинации в прицентромерном гетерохроматине. В соответствии с этим, мы обнаружили, что мутации по гену *Non3* приводят к задержке репарации двуцепочечных разрывов хромосом в ходе оогенеза *D. melanogaster*.

Выводы. Выявлено изменение структуры прицентромерного гетерохроматина на фоне мутаций по гену *Non3*. Это может являться одной из причин нарушения формирования митотического веретена деления.

Работа выполнена при поддержке РФФИ #18-34-00699.

Список литературы.

1. Moutinho-Pereira S. et al. Genes involved in centrosome-independent mitotic spindle assembly in Drosophila S2 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110(49): 19808-19813 (2013).
2. Vernì F, Cenci G. The Drosophila histone variant H2A.V works in concert with HP1 to promote kinetochore-driven microtubule formation. Cell Cycle. 14(4):577–588 (2015).

Секция «Физиология и медицинская биохимия»

Ф1. NBCe1 как мишень действия пролактина в модели холестаза беременных у крыс.

П.А. Абрамичева, Ю.Б. Костенко (ukostenko15@yandex.ru), Т.А. Балакина, О.В. Смирнова
Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Пролактин - пептидный гормон, влияющий не только на лактацию и родительское поведение, но и на протекание беременности и осморегуляцию. При холестазе беременных повышается уровень пролактина и на фоне этого наблюдается нарушение водно-солевого обмена [1,2]. Целью данной работы является поиск молекулярных мишеней натрийуретического действия пролактина в почке.

Материалы и методы. Крысы были разделены на 4 экспериментальные группы: интактные (норма), животные с холестазом, с гиперпролактинемией, определяющей ложную беременность, а также животные с гиперпролактинемией на фоне холестаза. Методика проведения необходимых для этих моделей операций на животных была описана нами ранее [1]. Выделяли внешний мозговой слой и кору почек животных и проводили вестерн блоттинг для определения уровня экспрессии натрий-бикарбонатного переносчика NBCe1. В качестве референсного белка использовали β-актин. Статистическую обработку проводили однофакторным ANOVA.

Результаты. Показано, что экспрессия белка NBCe1 снижалась во внешнем мозговом слое почки крыс при холестазе и при холестазе беременных по сравнению с нормой. При этом в коре изменений обнаружено не было.

Выводы. Установлено, что пролактин участвует в регуляции обмена натрия и бикарбонатов. Одной из мишеней натрийуретического действия пролактина во внешнем мозговом слое почки является белок NBCe1.

Список литературы.

1. Abramicheva P.A. et al. Role of Na+/K+-ATPase in natriuretic effect of prolactin in a model of cholestasis of pregnancy // Biochem. 2017. Vol. 82, № 5. P. 632–641.
2. Фидченко Ю.М., Кушнарева Н.С., Смирнова О.В. Влияние пролактина на водно-солевой обмен у самок крыс в модели холестаза беременных // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Vol. 156, № 12. P. 767–770.
3. Абрамичева П. А., Костенко Ю. Б., Балакина Т. А., Смирнова О. В. Молекулярные мишени натрийуретического действия пролактина в модели холестаза беременных у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Vol. 168, № 8. P. 171–175.

Ф2. Новые ингибиторы протеинкиназ нарушают сплайсинг РНК и вызывают гибель нейросфер глиобластомы

Т.Е. Аксинина (aks1195@mail.ru)[1], А.А. Штиль[2], М.И. Шахпаронов[3], М.С. Павлюков[3]
[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биохимии
[2]Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина
[3]Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Введение. Глиобластома – агрессивная опухоль головного мозга. Одним из механизмов, позволяющих глиобластоме развивать резистентность к терапии, явля-

ется альтернативный сплайсинг пре-мРНК [1], регулируемый фосфорилированием-дефосфорилированием SRSF белков сплайсосомы. К основным протеинкиназам сплайсосомных белков относят NEK2, а также киназы семейства DYRK и Clk [2]. Нашими коллегами получены новые низкомолекулярные ингибиторы этих ферментов: CMP3A [3], EY404 и FG1059 [4], соответственно. Исследование действия указанных соединений на сплайсинг РНК и выживаемость нейросфер глиобластомы является целью данной работы.

Материалы и методы. Первичные культуры глиом получали из биоптатов пациентов. Молекулярные субтипы клеточных линий идентифицировали по экспрессии 12 генов определённой методом qRT-PCR. Пролиферацию и жизнеспособность клеток в присутствии CMP3A, EY404, FG1059 или противоопухолевых препаратов цисплатина и темозоламида определяли с помощью реагента AlamarBlue. Изменения сплайсинга 7 генов, чувствительных к ингибированию сплайсосомы, изучали с помощью RT-PCR; ингибитор сплайсинга пладиенолид Б [5] использовали как положительный контроль. Для исследования влияния FG1059 на внутриклеточную локализацию SRSF клетки глиобластомы трансфецировали плазмидами, кодирующими белки SRSF1-4, меченые GFP или RFP.

Результаты. Получено и охарактеризовано 12 линий нейросфер, для трех определено влияние исследуемых ингибиторов на сплайсинг РНК. FG1059 вызывал наибольшую гибель клеток глиобластомы и наиболее выраженные изменения сплайсинга пре-мРНК, сопровождаемое перераспределением SRSF белков с ядерного на цитоплазматическое, что указывает на гипофосфорилирование этих белков. Для уточнения механизма действия FG1059 будет проведён фосфопротеомный и транскриптомный анализ.

Выводы. Ингибитор протеинкиназ Clk FG1059 нарушает сплайсинг РНК и вызывает гибель нейросфер глиобластомы значительно эффективнее, чем стандартные препараты цисплатин и темозоламид. Этот результат позволяет предположить, что Clk – новая терапевтическая мишень лекарственных воздействий при глиобластоме.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований №20-04-00804.

Список литературы.

1. Marat S. Pavlyukov et al., Cancer Cell. 34(1), 119–135 (2018).
2. Zhihong Zhou and Xiang-Dong Fu, Chromosoma. 122(3), 191–207 (2013).
3. Jia Wang et al., J Clin Invest. 127(8), 3075–3089 (2017).
4. Helmi Tazarki et al., Eur J Med Chem. 166, 304–317 (2019).
5. Yoshihiko Kotake et al., Nature Chemical Biology. 3, 570–575 (2007).

Ф3. Катехин увеличивает активность ангиотензинпревращающего фермента в аорте крыс

В.А. Аникина[1,2] (viktoriya.anikina@list.ru), Ю.Н. Корыстов[2]
[1]ФГБОУ ВО «Пущинский Государственный Естественно-Научный Институт», Россия, Пущино
[2]ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Россия, Пущино

Введение. Основная причина атеросклероза – повышенная активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) [1]. Потребление продуктов богатых флавоноидами, например, чая, содержащего в своём составе около 30% катехинов и его

производных, может заменить синтетические ингибиторы АПФ. Целью работы стало исследование изменения активности АПФ в аорте крыс после введения раствора (±) катехина.

Материалы и методы. Активность АПФ определяли в сегментах аорты крыс Wistar по гидролизу гиппурил-гистидин-лейцина по модифицированному методу Акерманна с соавторами [2]. Матричный раствор (±) катехина (Сигма, США) 1мг/мл готовили в смеси диметилсульфоксида с этанолом (1/4) и разводили физиологическим раствором до нужных концентраций. Животным раствор катехина вводили внутрибрюшинно в объёме 0.6 мл.

Результаты. Активность АПФ после внутрибрюшинного введения 1 мкг/кг катехина возрастает до 3 ч, а к 24 ч становится близкой к контролю. Для времени максимального эффекта (3 ч) была исследована дозовая зависимость эффекта катехина на АПФ от 0.01 до 3 мкг/кг. Отмечено, что при дозе 0.1 мкг/кг эффект достигает максимума и с дальнейшим увеличением дозы не возрастает. Флавоноид дигидрокверцетин (ДГК) снижал эффект катехина на АПФ, а блокатор адгезии моноцитов к эндотелию сосудов фукоидин полностью его снимал.

Выводы. В настоящей работе показано увеличение активности АПФ в аорте после внутрибрюшинного введения смеси (±) катехина. ДГК в дозе 10 мкг/кг снижает эффект катехина, а фукоидин снимает его полностью. Это свидетельствует об участии адгезии лейкоцитов на эндотелий в увеличении активности АПФ при действии катехина, поскольку фукоидин блокирует этот процесс.

Список литературы.

1. Paul M., Mehr A.P., Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems: Physiol Rev. 86, 747–803 (2005).
2. Ackermann A., Fernandez-Alfonso M. S., Sanchez-de-Rojas R., et al. // Br. J. Pharmacol. 124, 2, 291–298 (1998).

Ф4. Изменения биохимических показателей основных метаболических обменов в патологических процессах печени

Е.А. Гайдабура (alena.gajdabura@mail.ru)[1], М.Л. Золотавина[1], А.В. Братова[2]
[1]Кубанский государственный университет, Россия, Краснодар
[2]НИИ – Краевая клиническая больница № 1, Россия, Краснодар

Введение. При заболеваниях печени различной этиологии происходят изменения биохимических показателей сыворотки крови, при этом каждый из гепатитов характеризуется своими особенностями, отражающимися в течении патологического процесса. Цель работы: определение изменений биохимических показателей метаболических обменов в сыворотке крови больных, вызванных гепатитами различной этиологии.

Материалы и методы. Сыворотку крови 415 больных с патологиями печени исследовали на биохимическом анализаторе Beackman Coulter AU480, определяя содержание в сыворотке крови показатели белкового, липидного, углеводного и пигментного обменов. Для исследования использовались спектрофотометрические методы и ИФА. Исследуемая сыворотка крови принадлежала группам мужчин: 18-44 лет - aM, 45-59 лет - bM, 59-64 лет - cM и женщин: 18-44 лет - aЖ, 45-59 лет - bЖ, 59-64 лет - cЖ.

Материал собирался у пациентов с ХВГС, токсическим гепатитом и АИГ [1].

Результаты. Развитие токсического гепатита влияло на показатели белкового обмена. Содержание альбумина в сыворотке крови, имеющее прямую зависимость от возраста, значимо уменьшалось в крови в группе аМ до 21,3±0,9 г/л (p<0,01) и до 24,1±0,82 (p<0,01) - в группе аЖ. Поскольку белковый обмен тесно связан с углеводным, то изменениям также оказались подвержены показатели углеводного обмена: уровень глюкозы в сыворотке крови поднимался до значений 7,2±0,41 ммоль/л (p<0,01) на фоне увеличения активности ГГТ в группе аМ, bМ и сМ до 483,7±27,4 Ед/л (p<0,01) и 309,3±1,8 Ед/л (p<0,01) - в группах аЖ, bЖ и сЖ. При этом было отмечено увеличение активности АЛТ до 140,1±19,8 Ед/л (p<0,01) в группе bЖ с ХВГС. Содержание общего белка в сыворотке крови повышалось незначительно, в основном за счет увеличения белков острой фазы. Характерными для гепатита вирусной этиологии являлись изменения в пигментном обмене. Высокий уровень общего билирубина был отмечен в группе мужчин, в особенности в группе аМ - 167,74±1,7 мкмоль/л (p<0,01). Наиболее значимые отклонения от нормы в липидном обмене наблюдались при аутоиммунном гепатите. Была отмечена тенденция повышения уровня холестерина в сыворотке крови больных группы сЖ до 8,0 ммоль/л, а также значимое увеличение содержания триглицеридов в крови пациентов до 2,03±0,25 ммоль/л (p<0,01). Для больных с АИГ характерной особенностью в изменении пигментного обмена оказалось значительное повышение концентрации конъюгированного билирубина до значений 17,1±0,7 мкмоль/л (p<0,01) в группе bМ и 15,1±0,5 мкмоль/л (p<0,01) в группе bЖ. Содержание общего белка в сыворотке крови составило 87,3±2,9 (p<0,01) в группе аМ и 88,6±2,7 (p<0,01) - группе аЖ.

Выводы. При токсическом гепатите значимые изменения отмечались в показателях белкового и углеводного обменов, при ХВГС - в пигментном обмене. Развитие АИГ характеризовалось значительными отклонениями в липидном, пигментном и белковом обменах сыворотки крови больных.

Список литературы.

1. Славко Е.А., Зубова Н.В. Клинико-лабораторные особенности течения аутоиммунного гепатита (АИГ) // Медицина Алматы. 2018. №3. С. 162 -167.

Ф5. Эндокринный статус белых крыс при однократном введении этанола и морфолина. Сравнительная оценка

В.О. Ганецкая (viktoria1234525@mail.ru)
Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь, Гродно

Введение. Исследований, посвященных сравнительному изучению влияния однократного введения алкоголя и морфина на морфофункциональное состояние желез внутренней секреции, практически не выполнялось. Целью работы являлся сравнительный анализ действия однократно введенного алкоголя и морфина на эндокринную деятельность щитовидной и поджелудочной железы.

Материалы и методы. Первой группе крыс внутрижелудочно вводили физраствор (контроль), второй однократно алкоголь и морфин в малых дозах (1 г/кг и 10 мг/кг), третьей – среднее количество алкоголя и морфина (2,5 г/кг и 20 мг/кг), а четвертой – высокие экспериментальные дозы алкоголя (5 г/кг) и морфина (40 мг/кг). Уровень гликемии исследовали глюкооксидазным методом, концентрацию инсулина и тиреоидных гормонов в крови – методом ИФА.

Результаты. При острой алкогольной интоксикации (1 г/кг) на фоне нормального уровня глюкозы в крови содержание инсулина снижалось, а острая морфиновая интоксикация (10 мг/кг) сопровождалась гипергликемией при нормальном уровне гормона. Средние количества алкоголя и морфина (2,5 г/кг и 20 мг/кг), вызывали разнонаправленные изменения уровней гликемии и инсулина в крови. Как при острой алкогольной, так и морфиновой интоксикации отмечались гипертироксинемия, увеличение концентрации ТТГ, а также отсутствие эффектов на уровень Т3. Была установлена однонаправленность эффектов больших доз алкоголя и морфина на эндокринную функцию щитовидной железы, а также на уровень ее регуляторного показателя (рост уровней Т4 и ТТГ).

Выводы. Выраженность эффектов однократно вводимого этанола и морфина на эндокринный статус щитовидной и поджелудочной железы определяется их дозами, а также особенностями метаболизма исследованных гормонов в организме.

Ф6. Изучение нейропротекторных свойств внеклеточных везикул мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

В.В. Головичева (vv@golovicheva.ru)[1,3], Т.И. Данилина[1], Ю.А. Шевцова[2], К.В. Горюнов[2], М.В. Гуляев[4], Е.А. Туровский[3], Д.Н. Силачев[1,2], Е.Ю. Плотников[1], В.П. Зинченко[3], Д.Б. Зоров[1]

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

[2]Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени акад. В.И. Кулакова

[3]Институт биофизики клетки РАН

[4]Лаборатория магнитной томографии и спектроскопии факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В.Ломоносова

Введение. Эффективность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в терапии различных повреждений мозга показана во многих исследованиях. Предполагается, что терапевтический эффект обусловлен паракринной сигнализацией через внеклеточные везикулы (ВВ).

Материалы и методы. Оценку терапевтической способности ВВ в физиологических условиях при интраназальном (и/н) и внутривенном (в/в) введении проводили на моделяхчерепномозговой травмы (ЧМТ) взрослых крыс и неонатальной гипоксиишемии (ГИ) семисуточных крысят. Неврологический дефицит оценивался в тестах «Цилиндр», «Ротатрод» и «Постановка конечности на опору». Объем повреждения оценивали по МР-изображениям. Для более детального изучения терапевтических механизмов ВВ использовали модель кислородно-глюкозной депривации (OGD) и модель NH4CL-токсичности на нейроглиальной культуре клеток гиппокампа крысы, клетки предварительно инкубировали 24 часа с различными концентрациями ВВ. Уровень $[Ca^{2+}]_i$ клеток оценивали с помо-щью красителя Fura-2AM (1 мкг/мл).Число жизнеспособных и мертвых клеток определяли с использованием двойного окрашивания Hoechst 33342 (1 мкг/мл) и Propidiumiodide (1 мкг/мл).

Результаты. Курсовая и/н инстилляция ВВ статистически значимо восстанавливала неврологический дефицит 14-е и 30-е сутки после ЧМТ и ГИ. При 24 часовой инкубации культуры клеток с ВВ наблюдалось достоверное снижение гибели клеток после последующей 40 минутной OGD. После инкубации с ВВ (24ч) наблюдали достоверное снижение амплитуды $[Ca^{2+}]_i$ ответа клеток на стимуляцию потенциалзависимых

кальциевых каналов. Инкубация культуры с ВВ приводит к значимому увеличению процента выживающих клеток после 42 часов воздействия 10 мМ NH_4CL. Также было показано, что ВВ достоверно увеличивают длину нейритов в динамике нормальных условий роста нейроглиальной культуры.

Выводы. Вероятно, нейропротекторные свойства ВВ в физиологических условиях обусловлены воздействием ВВ на AMPAи NMDA-рецепторы (снижение амплитуды ответа $[Ca^{2+}]_i$ на ГИ) и влиянием на рост нейритов. В дальнейшем мы планируем проверить уровень экспрессии субъединиц возбуждающих рецепторов на фоне разных концентраций ВВ.

Работа поддержана грантом РФФИ 20-015-00414

Ф7. Уровень экспрессии генов toll-подобных рецепторов изменяется в структурах мозга крыс в период отмены алкоголя

С.О. Ереско (erescko.sergei@yandex.ru)[2,3], М.Е. Спешилова[1], М.И. Айрапетов[1,3]

[1]Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

[2]Университет ИТМО, Санкт-Петербург

[3]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

Введение. В последнее время появляется все больше публикаций, в которых изучаются механизмы нейроиммунных взаимодействий в головном мозге при различных патологических состояниях, включая алкогольную интоксикацию. Особую роль в этих процессах играют TLRs (toll-подобные рецепторы), однако уровень экспрессии генов TLRs не был изучен в структурах головного мозга крыс, ассоциированных с развитием алкоголизма.

Цель. Определить содержание мРНК TLRs в головном мозге крыс в условиях алкогольной интоксикации и при отмене алкоголя.

Материалы и методы. Крысы Вистар (n=48) употребляли 20%-ый этанол 1 мес, группа контроля (n=8) получала воду. Далее крыс декапитировали, извлекали необходимые структуры мозга: (гиппокамп (HYP), амигдала (AMG), медиальная энторинальная кора (mEC)). РНК выделяли с помощью TRIzol («Ambion», США). ОТ проводили с использованием M-MuLV («Promega», США). Реал-тайм ПЦР («Mx3005P», «Stratagene», США) проводили с использованием SYBR Green («Евроген», Россия). Данные нормированы к уровню экспрессии гена *Gapdh*.

Результаты. В группе алкоголизации был повышен уровень только мРНК TLR3 в HYP. Отмена этанола приводит к повышению уровня мРНК TLR3 в HYP на всех сроках отмены.; в mEC понижается на 1-е сут., повышается на 14-е сут.; в AMG повышаетя на 1-е сут., на 7-е сут. достигает уровня контроля, на 14-е сут. ниже уровня контроля. Содержание мРНК TLR4 понижено в HYP на 7-е сут; в mEC и AMG увеличивался на 1-е сут., далее снижается, достигнув уровня контроля на 7-е сут, на 14-е сут. отмены показатели ниже уровня контроля. Уровень мРНК TLR7 в HYP повышен на всех сроках отмены; в mEC не наблюдается изменений; в AMG снижается на 14-е сут. отмены.

Выводы. В группе длительной алкоголизации было получено увеличение уровня мРНК TLR3 только в гиппокампе. Однако экспрессия генов TLRs изменяется во всех исследуемых нами структурах головного мозга крыс в период отмены алкоголя.

Список литературы.

1. Airapetov M.I. et al., Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B: Biomedical chemistry. 13(1), 93-96 (2019).
2. Crews F.T. et al., Psychopharmacology. 234(9-10), 1483-1498 (2017).
3. Sanchez-Alavez M. et al., Alcohol. 76, 37-45 (2018).

Ф8. Кратковременное и долговременное влияние ICV введения уабаина на дофаминовую регуляцию физиологической активности у мышей линии

Р.Б. Казанская (st059046@student.spbu.ru)[1], Ю.А. Тимошина[2,3], А.В. Лопачев[2], А.Б.Вольнова[1,4], Д.А. Абаимов[2], Т.Н. Федорова[2], Р.Р. Гайнетдинов[4]

[1]Биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург

[2]Научный центр неврологии, Россия, Москва

[3]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

[4]Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Ингибирование Na,K-АТФазы в мозге кардиотоническим стероидом уабаином приводит к проявлению мание-подобного поведения у мышей. Целью данной работы была оценка краткосрочных и долгосрочных эффектов уабаина на дофаминовую регуляцию локомоторной активности мышей и D2-зависимые сигнальные каскады.

Материалы и методы. Самцам мышей линии C57Black вводили интрацеребровентрикулярно по 0,5 мкл 50 мкМ уабаина билатерально. Оценка локомоторной активности проводилась в открытом поле на протяжении 20 минут. Анализ уровня активации киназ проводился при помощи сравнения общего и фосфорилированного количества фермента методом Western Blot. Уровень метаболитов оцеивали при помощи ВЭЖХ с электрохимической детекцией.

Результаты. Введение уабаина привело к 1,5-кратному увеличению общего расстояния, пройденного мышью в течении 20 минут в тесте открытого поля, и ярко выраженному исследовательскому и стереотипическому поведениям. Через час после введения уабаина содержание в стриатуме метаболитов дофамина: 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (DOPAC) увеличивалось в 1,32 раза и гомованилиновой кислоты (HVA) в 1,42 раза по сравнению с контрольной группой. Введение уабаина также приводило к активации киназ Akt и ERK1/2 и деактивации GSK3β в стриатуме мышей через 30 минут после инъекции. При ежедневном введении на протяжении четырех дней замечалось снижение проявления эффектов уаабаина на двигательную активность мышей. При долгосрочном введении также снижалась активация Akt и количество NR2B, уровень активации ERK1/2 и соотношение белков семейства BCL2 не изменялись.

Выводы. Уабаин вызывает изменение активации сигнальных каскадов, ассоциированных с D2 рецепторами. При долгосрочном введении развивается десенситизация к уабаину, и переключение с быстрых G-белок зависимых сигнальных каскадов на более медленный β-аррестиновый путь.

Ф9. Изменение экспрессии гена противовоспалительного цитокина интерлейкина-10 и его белка на разных этапах нейродегенерации гиппокампа крыс, вызванной интоксикацией хлоридом триметилолова

Э.Р. Камалтдинова (alissa94@mail.ru)1,2, Е.В. Першина1, В.И. Архипов1,2
1Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Россия, Пущино
2Пущинский государственный естественно-научный институт, Россия, Пущино

Введение. Ввиду отсутствия эффективной терапии нейродегенеративных заболеваний, изучение механизмов нейроденерации является актуальной проблемой современности. В работе исследовали изменение экспрессии гена и содержания белка противовоспалительного цитокина интерлейкина-10 (ИЛ-10) в гиппокампе крыс после введения нейротоксиканта хлорида триметилолова (ТМТ). Маркером нейровоспаления была выбрана циклооксигеназа-2 (ЦОГ-2).

Материалы и методы. Крысам линии Вистар делали инъекцию внутрибрюшинно ТМТ в дозе 7,5 мг/кг. Нейродегенеративные изменения в гиппокампе изучали на сроках от 1 до 6 недель после ТМТ-интоксикации. Для определения уровня мРНК исследуемых генов применяли метод ОТ-кПЦР. Количественное содержание белка определяли методом сэндвич-ИФА. Статистическую обработку результатов проводили с применением однофакторного дисперсионного анализа и последующим сравнением с использованием критерия Даннета.

Результаты. В гиппокампе уровень мРНК ЦОГ-2 оказался повышенным через 1 и 3 недели после инъекции ТМТ, а в префронтальной коре – через 3 и 6 недель, что свидетельствует о развитии нейровоспаления в эти сроки. Экспрессия ИЛ-10 также была повышена в этот период. По результатам иммуноферментного анализа не было выявлено изменений в количественном содержании белка ИЛ-10 в гиппокампе через 2 и 4 недели после ТМТ-интоксикации. В префронтальной коре наблюдалось значительное увеличение содержания белка ИЛ-10 на обоих исследуемых сроках.

Выводы. Принимая во внимание, что после ТМТ-интоксикации гибель нейронов наиболее выражена в гиппокампе, можно заключить, что повышение экспрессии ИЛ-10 в этой структуре мозга оказалось недостаточным для увеличения уровня белка, необходимого для выживания нейронов. В отличие от гиппокампа, повышенный синтез белка ИЛ-10 в префронтальной коре способствовал выживанию нейронов в условиях ТМТ-интоксикации.

Ф10. Сравнение миелоидных и лимфоидных клеток иммунного инфильтрата в различных инокулированных опухолях лабораторных мышей

М.С. Клименко (klimenkom8@mail.ru), А.В. Пичугин, Р.И. Атауллаханов
Институт иммунологии ФМБА России

Введение. Для изучения взаимодействия опухолей с инфильтрирующими клетками иммунной системы используются разные модели. Представляет интерес выяснение универсальности данных моделей. Целью работы является сравнение клеточного состава и функциональных характеристик микроокружения первичных опухолей, а также сравнение влияния опухолевого процесса на организм в моделях миеломы SP2/0 и рака молочной железы 4T1 у мышей BALB/c.

Материалы и методы. Мышам подкожно вводили клетки опухолевых линий SP2/0 и 4T1. После достижения объема 200-350мм^3 опухоль изымалась и отправлялась на цитофлуориметрический анализ клеточных популяций. Было проанализировано функциональное состояние миелоидных клеток, выделенных из ткани первичной опухоли, по уровню продукции мРНК различных генов в исследуемых группах мышей. Также у мышей изучали системные изменения в составе лейкоцитов в периферической крови и селезёнке. Помимо этого проводился анализ содержания различных цитокинов в сыворотке крови и культуральной среде линий SP2/0 и 4T1. Цитофлуориметрические данные были получены с помощью прибора BD FACS AriaII.

Результаты. Опухоль 4T1 привлекает больше лейкоцитов, чем опухоль SP2/0. Также 4T1 инфильтрирована миелоидными клетками, в то время как ткань опухоли SP2/0 преимущественно содержит лимфоциты. Рост карциномы 4T1 сопровождался распространением миелоидных клеток в крови и селезенке. В популяциях миелоидных клеток микроокружения 4T1 наблюдается высокая экспрессия мРНК генов *inos* и *arg-1*. В микроокружении опухоли SP2/0 макрофаги экспрессируют мРНК противовоспалительных генов *il10* и *tgf-β1*. Уровень IL10 в крови мышей с опухолью SP2/0 выше, чем в крови интактных мышей и в крови мышей с опухолью 4T1. Кроме того, культура клеток SP2/0 сама по себе процуцирует данный цитокин.

Выводы. Опухоли 4T1 и SP2/0 запускают различные типы иммуносупрессии: опухоль 4T1 индуцирует иммуносупрессию «MDSC-типа», а опухоль SP2/0 - «TAM-типа».

Ф11. Влияние астаксантина на функциональное состояние митохондрий сердца крысы при острой сердечной недостаточности

Р.Р. Крестинин (rkrestinin@bk.ru)[1,2], Ю.Л. Бабурина[1], Л.Д. Сотникова[1], О.В. Крестинина[1,2]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики, Россия, Пущино

[2]Пущинский государственный естественно-научный институт, Россия, Пущино

Введение. Астаксантин (АСТ) является производным кетокаротиноидов [1]. АСТ улучшает функциональные характеристики органов и тканей, которые подвергаются острому окислительному стрессу и может играть ключевую роль в предотвращении инфаркта миокарда [2]. При различных патологиях в митохондриях может происходить открытие неспецифической поры (мРТР) - мегаканала во внутренней мембране митохондрий. Целью данной работы является исследование функциональных параметров функционирования мРТР: Ca^{2+} ёмкость, изменение мембранного потенциала, митохондриальное набухание и изменение активности комплексов дыхательной цепи и уровней их субъединиц в митохондриях сердца крыс при хроническом введении АСТ в условиях острой сердечной недостаточности (ОСН).

Материалы и методы. Для исследования использовали 4 группы крыс линии Wistar (2-3 месяца): 1 группа – контрольная, 2 группа – хроническое введение АСТ (в течении 14 суток) [3], 3 группа – инъекция изопротеринола (ISO) (85 мг/кг дважды) [4], 4 группа - хроническое введение АСТ и инъекция ISO.

Результаты. ISO индуцировал открытие мРТР, повышал Ca^{2+} ёмкость и ускорял набухание митохондрий. При этом активность комплексов дыхательной цепи снижалась. АСТ снимал индукторное действие ISO, замедлял открытие мРТР и повышал активность комплексов дыхательной цепи.

Выводы. Введение АСТ улучшало функциональное состояние митохондрий сердца крыс, АСТ снимал индуцирующее действие ISO, тем самым оказывал защитное действие, активность комплексов дыхательной цепи переноса электронов снижалась при ОСН, АСТ восстанавливал активность комплексов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 20-04-00131

Список литературы.

1. J. Yuan et al., Mol. Nutr. Food Res. 55, 150–165 (2011).
2. W. Pongkan et al., Mol. Nutr. Food Res. 61, 1601077 (2017).
3. Yu. Baburina et al., Antioxidants. 8 (12), 576 (2019).
4. I. Odinokova et al., Int J Mol Sci. 19(6), 1555 (2018).

Ф12. Обоснования выбора методов ИФА и ПЦР в диагностике вирусных инфекций

А.С. Михальченко (anastasmihalchenko@gmail.com)[1], М.Л. Золотавина[1], А.В. Братова[2]
[1]Кубанский государственный университет, Россия, Краснодар
[2]НИИ-ККБ №1 им. С. В. Очаповского, Россия, Краснодар

Введение. Сегодня отмечены значимые успехи в диагностике вирусных заболеваний, но вопрос выбора методов остается до конца не решённым. Целью работы является определение особенностей методов ИФА и ПЦР, применяющиеся в исследовании инфекционных заболеваний.

Материалы и методы. В работе использовали результаты обследования 290 образцов крови пациентов с заболеваниями ВЭБ, ЦМВ, гепатитами В и С. Применены методы ИФА (набор реагентов «Вектор-Бест») и ПЦР (набор реагентов «ДНК-технологии»).

Результаты. В настоящее время в современной диагностике вирусных заболеваний используют методы ПЦР, прямого и непрямого ИФА.

В отсутствии антител IgG к NA к ВЭБ и IgG к ЦМВ в сыворотке крови не выявлялась ДНК вирусов в плазме крови, что соответствует 100 % корреляции (Таблица 1).

Таблица 1 - Анализ антител ВЭБ и ЦМВ к ДНК ВЭБ и ЦМВ

	ИФА		ПЦР		Корреляция, %
Вирус	титр	всего проб	(+)	(-)	
ВЭБ	не обнаружено	2	0	2	100 %
	<10	15	3	12	20 %
	>10	94	2	92	2 %
ЦМВ	не обнаружено	3	0	3	100 %
	<10	39	1	38	2,5 %
	>10	69	2	67	2,9 %

Из 15 положительных проб в низком титре антител IgG к NA в сыворотке крови ДНК в плазме крови была выявлена в трех пробах. Из 39 положительных проб в низком титре антител IgG в сыворотке крови ДНК была обнаружена в плазме крови в одной пробе. У 94 пациентов, имевших антитела IgG к NA в сыворотке крови в высоком титре, ДНК в плазме крови выявлялась у двоих пациентов. У 69 пациентов, имевших антитела IgG в высоком титре в сыворотке крови, ДНК в плазме крови выявлялась у двоих.

В диагностике вируса гепатита В результаты анализов совпали в 10 случаев из 15. В диагностике вируса гепатита С из 56 проб результаты анализов совпали в 53 случаев (Таблица 2).

Таблица 2 - Анализ на гепатиты В и С, полученные двумя методами

Вирус	Всего проб	ПЦР		ИФА			Корреляция, %
		(+)	(-)	показатель	(+)	(-)	
ВГВ	15	10	5	ДНК	15	0	66 %
ВГС	56	53	3	IgG, IgM	56	0	94 %

В диагностике вируса гепатита В результаты анализов совпали в 10 случаев из 15. В диагностике вируса гепатита С из 56 проб результаты анализов сошлись в 53 случаях. В диагностике вирусов гепатитов В и С при использовании методов ИФА и ПЦР результаты анализов совпали в более половины случаев. При совместном применении методов ИФА и ПЦР в диагностике герпесвирусных инфекций совпадения результатов встречались редко. Главной особенностью герпесвирусов и вирусов гепатита В и С - способность к латенции.

Выводы. Метод ИФА позволяет дифференцировать стадии вирусных заболеваний; метод ПЦР определяет в основном активную стадию инфекционных заболеваний. При совместном применении прямого ИФА и ПЦР результаты анализов совпадают в более половины случаев.

Ф13. Тромбин и BDNF регулируют размер кванта в новообразованных моторных синапсах мыши

Е.С. Правдивцева, П.О. Богачева
Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва.

Введение. В моторных синапсах может осуществляться ретроградная регуляция синаптической передачи с участием миокинов - соединений, высвобождаемых из мышечных волокон [1]. Среди них большой интерес вызывают нейротрофин мозга BDNF и сериновая протеиназа тромбин [2, 3]. Целью работы было выявить способность тромбина и BDNF регулировать размера кванта ацетилхолина в новообразованных моторных синапсах мыши.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на изолированных препаратах m. EDL мыши на 11 сутки после передавливания двигательного нерва (что запускало процессы регенерации и новообразования синапсов). Для внутриклеточной регистрации одноквантовых спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) использовали стандартную микроэлектродную технику отведения биопотенциалов. Статистическую обработку данных проводили при помощи критерия Стьюдента и двухфакторного ANOVA.

Результаты. В новообразованных синапсах мыши тромбин (1 нМ) увеличивал амплитуду МПКП на 40%, не влияя при этом на частоту и параметры временного хода. Этот эффект имел пресинаптическую природу и был связан с увеличением размера кванта медиатора, т.к. предотвращался блокатором везикулярного транспортера ацетилхолина везамиколом (1 мкМ). Однако рецепторы к тромбину (PAR-1) обнаружены только на постсинаптической мембране [4] поэтому объяснить его пресинаптический эффект можно запуском каскада с участием ретроградного посредника, например, BDNF. Действительно, увеличение амплитуды МПКП под действием тромбина предотвращалось также и блокатором рецепторов BDNF TrkB циклотраксином B (100 нМ). Сам BDNF (1 нМ) повторял эффект тромбина и приводил к возрастанию амплитуды МПКП, а предварительная блокада TrkB циклотраксином B и ANA-12 (1 мМ) полностью предотвращала это.

Выводы. В новообразованных моторных синапсах тромбин способен запускать высвобождение BDNF из мышечных волокон и приводить к усилению спонтанной синаптической передачи через увеличение размера кванта ацетилхолина.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00616.

Список литературы.

1. Giudice, Taylor, Curr. Opin. Pharmacol. 34, 49-55 (2017).
2. Zoubine et al., Dev. Biol. 179(2), 447-457 (1996).
3. Matthews et al., Diabetologia. 52(7), 1153-1160 (2009).
4. Lanuza et al., J. Neurosci. Res. 85(4), 748-756 (2007).

Ф14. Цитотоксические эффекты новых производных секоизоларицирезинола диглюкозида в клетках рака молочной железы

Д.И. Сальникова (dianasalnikova08@yandex.ru)[1], А.М. Щербаков[2], О.Е. Андреева[2], Е.И. Михаевич[2], О.В. Стасевич[3]

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Россия, Москва

[2]НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва

[3]Белорусский государственный технологический университет, Республика Беларусь, Минск

Введение. Рак молочной железы - наиболее частая форма рака у женщин. Несмотря на значительные успехи таргетной терапии, поиск новых лекарственных кандидатов остается актуальным. Лигнаны – класс природных соединений полифенольной структуры. Лигнаны и их метаболиты могут напрямую ингибировать рост злокачественных клеток. Кроме того, соединения этого класса снижают воспаление в прилежащей ткани. Молекулярный механизм действия лигнанов на пролиферацию опухолевых клеток выясняется.

Материалы и методы. Получение лигнана секоизоларицирезинола диглюкозида (L1) из семян *Linum usitatissimum* – экстракция 50% этанолом, хроматографическая очистка на ионообменном сорбенте Diaion HP-20 и обращённо-фазовом силикагеле C18 (чистота продукта - 95,3%). Кислотный гидролиз L1 – синтез секоизоларицирезинола (L2). Реакция с ацетилхлоридом – получение секоизоларицирезинола-4′,4′′-диацетата (L3) из L2. Биологические методы: иммуноблоттинг, МТТ-тест и ген-репортерный анализ.

Результаты. Все три соединения не проявляли цитотоксическую активность в клетках эпителия MCF-10A. Соединение L1 не оказывало цитотоксические эффекты на MCF-7 и MCF-7/T (резистентная к тамоксифену сублиния). L2 снижало пролиферацию MCF-7. L3 демонстрировало цитотоксические свойства на MCF-7 и MCF-7/T. L2 и L3 вызывали фрагментацию PARP (маркёр апоптоза). L3-индуцированная гибель клеток происходит при участии сигналинга ERK по механизму, не зависящему от p53. Оба соединения комплексно действуют на сигнальный путь ERα/AP1. L2 и L3 подавляли транскрипционную активность ERα и AP1 и приводили к выраженной деградации белка ERα. L3 заметно усиливало действие доксорубицина на MCF-7.

Выводы. L2 и L3 избирательно снижают пролиферацию опухолевых клеток MCF-7 и MCF-7/T, не затрагивая при этом нормальный эпителий молочной железы MCF-10A. Сигнальный путь ERα/AP1 является основной клеточной мишенью синтезированных производных лигнана. Комбинация L3 с доксорубицином представляет интерес для дальнейшего исследования.

Работа выполнена при поддержке РФФИ #18-29-09017 (биологические исследования).

Список литературы.

1. N.R. Shah, B.M. Patel. Secoisolariciresinol diglucoside rich extract of L. usitatissimum prevents diabetic colon cancer through inhibition of CDK4, Biomed Pharmacother. 83, 733-739 (2016).
2. D.M. Delman, C.J. Fabian, B.F. Kimler, H. Yeh, B.K. Petroff. Effects of Flaxseed Lignan Secoisolariciresinol Diglucosideon Preneoplastic Biomarkers of Cancer Progression in a Model of Simultaneous Breast and Ovari-an Cancer Development, Nutr Cancer. 67(5), 857-864 (2015).
3. A. Ayella, S. Lim, Y. Jiang, T. Iwamoto, D. Lin, J. Tomich, W. Wang. Cytostatic inhibi-tion of cancer cell growth by lignan secoisolariciresinol diglucoside, Nutr Res. 30(11), 762-769 (2010).
4. J.D. Ford, K.S. Huang, H.B. Wang, L.B. Davin, N.G. Lewis. Biosynthetic pathway to the cancer chemopreventive secoisolariciresinol diglucoside-hydroxymethyl glutaryl ester-linked lignan oligomers in flax (Linum usitatissimum) seed, J Nat Prod. 64(11), 1388-1397 (2001).
5. P. Basu, C. Maier. Phytoestrogens and breast cancer: In vitro anticancer activities of isoflavones, lignans, coumestans, stilbenes and their analogs and derivatives, Biomed Pharmacother. 107, 1648-1666 (2018).

Ф16. Хорионический гонадотропин в регуляции дифференцировки Т-хелперов 17-го типа

С.В. Ужвиюк[1,2], В.П. Тимганова[1], М.С. Бочкова[1], С.А. Заморина[1,2]

[1]«ИЭГМ УрО РАН» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН), Пермь, Россия

[2]ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Введение. Одним из факторов, обеспечивающих состояние иммунологической толерантности при беременности, является хорионический гонадотропин (ХГЧ). При нормально текущей беременности количество провоспалительных Т-хелперов 17 типа (Th17) снижается. Целью работы являлась оценка влияния ХГЧ на конверсию наивных Т-хелперов в фенотип Th17.

Материалы и методы. Использовали нативный («Московский эндокринный завод», Россия) и рекомбинантный («Ovitrell»,«MercSerono», Италия) препараты ХГЧ (10, 100 МЕ/мл). Монокультуры Т-хелперов получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS® («MiltenyiBiotec») из суспензии мононуклеар-

ных клеток периферической крови здоровых доноров (n=8). Выделенные клетки с фенотипом CD4+ (1×106кл/мл) культивировали в 96-луночных планшетах в полной питательной среде в течение 48ч при 370С, 5% СО2. В качестве активатора использовали анти-CD2/CD3/CD28 частицы («MiltenyiBiotec»), также, вносили ИЛ-1β и ИЛ-6 (10 нг/мл). При помощи проточного цитометра CytoFLEX S («BeckmanCoulter», США) определяли процент Ki67+, RORgt+(транскрипционный фактор Th17), RORgt+Ki67+, RORgt-Ki67+, RORgt+Ki67- в лимфоцитарном гейте. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPadPrizm 6 при помощи критерия Фридмана.

Результаты. Установлено, что ХГЧ не влияет на количество CD4+-лимфоцитов, экспрессирующих транскрипционный фактор RORgt (маркер Th17). Также оценили уровень экспрессии RORgt+ в пролиферирующих (Ki67+) и в не пролиферирующих (Ki67-) пулах клеток. Показано, что ХГЧ не влияет на количество пролиферирующих и не пролиферирующих Th17. Однако, было установлено, что рекомбинантная форма ХГЧ («Ovitrell», 100 МЕ/мл) оказывала стимулирующий эффект на пролиферацию Т-хелперов, не экспрессирующих RORgt.

Выводы. Таким образом, ХГ в условиях направленной индукции Т-хелперов в фенотип Th17 не регулирует пролиферацию и дифференцировку Th17, однако способен стимулировать пролиферацию других типов Т-хелперов в данной экспериментальной модели.

Исследование выполнено в рамках темы НИР№АААА-А19-119112290007-7.

Ф17. Влияние анандамида на спонтанную секрецию ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах мыши

Н.А. Хоткина (natashakhotkina@yandex.ru), Е.О. Тарасова, А.Е. Гайдуков, О.П. Балезина
Московский государственный университет, Россия, Москва

Введение. Анандамид (AEA) - эндоканнабиноид, образующийся при ферментативном расщеплении мембранных липидов и способный ретроградно влиять на выделение медиатора из пресинаптического окончания через каннабиноидные рецепторы CB1- и CB2-типа [1, 2]. Экспрессия этих рецепторов, а также ферментов метаболизма AEA была показана в скелетных мышцах [3]. Однако действие AEA в нервно-мышечных синапсах млекопитающих остаётся практически неизученным.

Материалы и методы. Исследования проводились на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмы мыши. Регистрировали миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) при помощи стандартной микроэлектродной техники отведения потенциалов. Достоверность различий между выборками оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа (1-way ANOVA), его непараметрических аналогов и t-критерия Стьюдента.

Результаты. Анандамид (20 мкМ) через час после аппликации приводил к достоверному снижению амплитуды МПКП по сравнению с контролем, а также к увеличению частоты МПКП. Для выявления вклада каннабиноидных рецепторов в этот эффект использовались избирательные обратные агонисты CB1- и CB2-типа рецепторов. Так как обратный агонист CB2-рецепторов AM-630 вызывал значительное увеличение амплитуды МПКП по сравнению с контролем, его дальнейшее использование оказалось затруднено. На фоне обратного агониста CB1-рецепторов AM-251, который сам по себе не оказывал влияния на спонтанную секрецию АХ, AEA не приводил к изменению ни частоты, ни амплитуды МПКП по сравнению с контролем.

Выводы. АЕА способен влиять на спонтанную секрецию АХ в нервно-мышечных синапсах мыши, действуя на CB1-рецепторы.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 19-04-00616а.

Список литературы.

1. R. Mechoulam et al., Nature Rev. Neurosci. AOP, published online 15 October 2014; doi:10.1038/nrn3811 (2014).
2. P.E. Castillo et al., Neuron. 76(1). 70–81 (2012).
3. A. Crespillo et al., Biochem. J. 433, 175–185 (2011).

Ф18. Нейропротекторная активность салицилкарнозина в модели ишемии на первичной культуре клеток больших полушарий головного мозга крысы

А.В. Хуторова (hutorova.anastasiya@mail.ru), Ю.А. Тимошина
Московский государственный университет, Россия, Москва

Введение. Активные формы кислорода (АФК) являются основными факторами, вызывающими апоптоз нейронов, после восстановления кровообращения в мозге при инсульте. Для борьбы с ними используют антиоксиданты, которыми могут являться производные эндогенного пептида карнозина (КН). Также в клинической практике при инсульте в качестве нейропротектора применяется аспирин (АСП). Предполагается, что салицилат карнозина (СК), продукт химического синтеза карнозина с салициловой кислотой (САЛ), может обладать нейропротекторными свойствами обоих исходных веществ. Целью данной работы является сравнение нейропротекторной активности СК, КН, АСП и САЛ в модели ишемии головного мозга на клеточной культуре.

Материалы и методы. Первичную культуру клеток коры больших полушарий мозга крыс подвергали глюкозо-кислородной депривации (ГКД) в течение 4 часов и добавляли СК, КН, АСП и САЛ в концентрациях 0,2, 0,5 и 1мМ до или после ГКД. Затем проводили тест МТТ, указывающий на выживаемость клеток. Данные о нейропротекторной активности СК подтверждали при помощи измерения активности фермента лактатдегидрогеназы, наличие которой в среде говорит о гибели клеток.

Результаты. В серии экспериментов ГКД приводила к снижению жизнеспособности культуры на 40-50%. Инкубация культуры с 0,5 мМ и 1 мМ СК во время и после ГКД приводила к значительному увеличению жизнеспособности культуры относительно группы без добавления нейропротекторов. САЛ, АСП и КН также проявляли нейропротекторные свойства. В то же время, только СК вызывал увеличение жизнеспособности культуры при инкубации с ним после ГКД. Также инкубация с СК значительно уменьшала активность ЛДГ в среде как при добавлении во время ГКД, так и после ГКД, что говорит об уменьшении количества погибших нейронов в культуре вследствие ГКД при его воздействии. В целом, СК проявил большую нейропротекторную эффективность, чем препараты сравнения в условиях ГКД.

Выводы. Поскольку СК является перспективным нейропротектором при глюкозо-кислородной депривации, целесообразно дальнейшее исследование его эффективности на модели фокальной ишемии с реперфузией головного мозга крыс.

Секция Биоинженерии и биотехнологии

БТ/БИ1. Сравнение проницаемости бутил(трифенил)фосфония и его аналогов через бислойные липидные мембраны с их накоплением в митохондриях печени крысы

Е.В.Александрова (k.alexandrova2009@yandex.ru)[1], Г.А.Коршунова[2], Л.С.Хайлова[2], Т.И.Рокицкая[2]
[1]Химический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия
[2]НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского, Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

Введение. В последние годы липофильные катионы активно используются для создания новых соединений с целью адресной доставки биологически важных молекул в митохондрии. Ранее было показано, что скорость трансмембранного проникновения катионов значительно меняется при введении заместителей в фенильном кольце додецил(трифенил)фосфония [1]. Целью данной работы является синтез бутил(трифенил)фосфония и его замещенных аналогов и сравнение их полной проницаемости через бислойные липидные мембраны (БЛМ) и степени накопления в митохондриях.

Материалы и методы. Синтез н-бутил трифенилфосфония, н-бутил три(р-фторфенил)фосфония, н-бутил три(р-хлорфенил)фосфония, н-бутил три(р-метоксифенил) фосфония, н-бутил три(р-толил)фосфония осуществляли следующим образом: 1-бромбутан вводили в реакцию с соответствующим триарилфосфином в присутствии этанола и бензола, смесь нагревали при 80°С в течение 2-4 дней. Проницаемость полученных катионов через липидные мембраны вычисляли на основании результатов измерения стационарного тока при постоянном напряжении на модельных плоских бислойных липидных мембранах. Накопление липофильных катионов в выделенных митохондриях печени крысы оценивали с помощью ТФФ+ селективного электрода [2].

Результаты. Проницаемость бутилтрифенилфосфония и его аналогов через БЛМ значительно различалась в зависимости от введенных заместителей в фенильном кольце катиона. Введение галогеновых заместителей уменьшало проницаемость липофильного катиона, а введение метильной или метоксигруппы увеличивало проницаемость. Концентрация изучаемых катионов в водном растворе хорошо определялась с помощью ТФФ+ селективного электрода. Оказалось, что время накопления проникающих катионов в митохондриях не зависит от их проницаемости. Однако более проникающие аналоги накапливаются в выделенных митохондриях печени крысы в большей степени.

Выводы. Показана корреляция между скоростью проникновения липофильных катионов через гидрофобный слой липидной мембраны, их полной проницаемостью и степенью накопления в выделенных митохондриях.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 19-04-00238.

Список литературы.

1. T.I. Rokitskaya et al., Phys. Chem. Chem. Phys. 21, 23355-23363 (2019).
2. N. Kamo et al., J. Membr. Biol. 49, 105-121 (1979).

БТ/БИ2. Эндолизины бактериофагов грамотрицательных бактерий LysAm24, LysAp22, LysECD7, LysSi3 и LysSt11 проявляют выраженную бактерицидную активность в отношении биопленок *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae*

А.М. Лендел (kazejosei@gmail.com)[1,2], Н.П. Антонова[1,2], И.Г. Григорьев[2], Д.В. Васина[2], В.А. Гущин[1,2]
[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва
[2]ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Россия, Москва

Введение. Литические ферменты бактериофагов считаются перспективной основой антибактериальных средств, и актуальным представляется изучение активности подобных ферментов в отношении биопленок — ключевых источников антибиотикорезистентности. Целью данной работы является исследование действия эндолизинов LysAm24, LysAp22, LysECD7, LysSi3 и LysSt11 в отношении бактериальных биопленок, сформированных *in vitro* (MtP assay) [1].

Материалы и методы. Биопленки клинических изолятов *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae* получали при инкубации (24 ч) культуры бактерий в питательной среде TSB (Tryptic soy broth) в 96-луночном планшете [2]. Отмытые от среды и подсушенные биопленки обрабатывали растворами эндолизинов в концентрации 100 или 1000 мкг/мл в течение двух часов. Содержимое лунок высушивали, окрашивали кристаллическим фиолетовым, растворяли в 33% уксусной кислоте и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 600 нм, согласно опубликованной методике [3]. Активность в отношении сформированных биопленок рассчитывали как соотношение оптической плотности обработанных эндолизинами проб и контрольных образцов без добавления ферментов. Все эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку проводили двухфакторным ANOVA.

Результаты. Изученные эндолизины в концентрации 1000 мкг/мл оказывали значительное деструктивное действие на сформированные плотные и умеренные биопленки *A. baumannii*: оптическая плотность окрашенного раствора снижалась в 2-3 раза после обработки LysSi3, LysSt11, а после инкубации с LysECD7, LysAm24 и LysAp22 наблюдалась полная элиминация биопленки. В отношении биопленок *K. pneumoniae* выявили менее выраженный, но значимый эффект.

В результате исследования было показано, что наиболее эффективным является LysECD7, 100 мкг/мл которого достаточно для практически полного разрушения сформированных биопленок обоих видов бактерий.

Выводы. LysAm24, LysAp22, LysECD7, LysSi3 и LysSt11 в изученных концентрациях приводят к значительному снижению плотности сформированных бактериальных биопленок и обладают выраженной антибактериальной активностью.

Список литературы.

1. S Kırmusaoğlu, Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Ac-tivity Methods, (London). Chapter 6 (2019).
2. S. Stepanović et al., APMIS. 115, 891–899 (2007).
3. D. Gutiérrez et al., PloS ONE. 9, e107307 (2014).

БТ/БИ3. Новый штамм каротиногенной микроводоросли *Bracteacoccus aggregatus* и его биотехнологические характеристики.

Д. С. Литвинов (danon6868@gmail.com)[1], Т. А. Федоренко[2], К. А. Чканов[2]
[1]Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия, Москва
[2]Кафедра биоинженерии, лаборатория общей симбиологии и клеточной инженерии, Россия, Москва

Введение. Каротиноиды – обширная группа липофильных пигментов тетратерпенового ряда, имеющих большое число полезных свойств [3]. Микроводоросли, *Dunaliella salina* и *Haematococcus lacustris*, – основной источник натуральных каротиноидов, β-каротина и астаксантина соответственно [3]. Оба микроорганизма характеризуются рядом недостатков, ограничивающих их использование. Цель работы: описание штамма микроводоросли BM5/15 – его предварительная идентификация и исследование продуктивности.

Материалы и методы. Клетки культивировали в фотобиореакторах в 400 мл минеральной среды BG-11 при 23 оС и освещении холодным белым светом (60 мкмоль/м^2/с). Для индукции синтеза каротиноидов помещали культуру в среду без минеральных источников азота при освещенности 480 мкмоль/м^2/с. Общее содержание пигментов проводили спектрофотометрически. Пигментный состав исследовали путем тонкослойной хроматографии. Фотосинтетическую активность оценивали по анализу кинетики флуоресценции хлорофилла а. Для молекулярно-биологической идентификации микроводоросли и состава ее микробного сообщества амплифицировали фрагмент ядерного рибосомального кластера генов, включающий внутренние транскрибируемые спейсеры и ген 5,8S рРНК (ITS1-5,8SrRNA-ITS2) [1] и гены 16S рРНК. Для автоматизации анализа последовательностей была написана программа на языке Python 3 (https://github.com/danon6868/Program-for-diploma).

Результаты. Исследуемый штамм был отнесен к виду *Bracteacoccus aggregatus*. Через 13 суток культивирования плотность культуры возрастала

> 5 раз – до 1,13 мг/мл сухой массы. Выяснилось, что клетки были способны накапливать два важных каротиноида: β-каротин и астаксантин; за 5 суток их общее содержание возрастало примерно в 4,5 раза — до 26 мг/л. Были выявлены различия в составе микробного сообщества на разных этапах культивирования.

Выводы. Штамм *B. aggregatus* BM5/15 способен накапливать два каротиноида, имеющих практическое значение. Изучение биотехнологических характеристик может помочь в дальнейшем увеличить его продуктивность.

Список литературы.

1. Ismagulova T. et al., Journal of Applied Phycology. 1-14 (2017).
2. Solovchenko A. E., Photosynthesis research. 125, 437-449 (2015).
3. Takaichi, S., Marine Drugs, 9(6), 1101-1118 (2017).

БТ/БИ4. Экспериментальная модель роста опухолевых клеток на микросферах из поли-3-оксибутирата

К.А. Меньших (kamenshikh@gmail.com)[1], В.В. Воинова[1], Т.К. Махина[2], Г.А. Бонарцева[2], К.В. Шайтан[1], А.П. Бонарцев[1]

[1]Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

[2]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Россия, Москва

Введение. Для исследования противоопухолевых препаратов в качестве переходного звена между моделями для скрининга *in vitro* и тестированием препаратов в организме рассматривают трёхмерные системы клеточных культур. Цель данной работы - создание 3D клеточных сфероидов на микросферах из поли-3-оксибутирата (ПОБ).

Материалы и методы. Для получения пористых микросфер с диаметрами различного диаметра использовался метод «водная фаза/масляная фаза/водная фаза» (W/O/W) с последующим вымыванием порообразователя - водного раствора карбоната аммония, способного к термическому разложению до аммиака и углекислого газа.

Для получения стабильных сфероидов клетки HEp-2 (рак гортани человека) культивировали совместно с пористыми микросферами из ПОБ на лунках, покрытых 1% агарозным гелем, в условиях постоянного перемешивания, температуры 37°C и 5% содержания CO2. Динамика клеточного деления и роста в сфероидах отслеживалась посредством МТТ-анализа, морфология сфероидов оценивалась визуально гистологическими методами, а также с помощью сканирующей электронной (СЭМ) и конфокальной микроскопии.

Результаты. Рост сфероидов достигал пика на 7-ые сутки культивирования, после чего число живых клеток падало как в контроле (сфероиды), так и в опыте (сфероиды с микросферами). При этом при культивировании с микросферами диаметром 50-100 мкм наблюдалась более активная пролиферация клеток, чем в контроле и в сфероидах с микросферами более 100 мкм. Исследование при помощи СЭМ также показало лучшее прикрепление и агрегацию клеток с микросферами меньшего диаметра.

Выводы. Подобный подход к созданию 3D клеточных моделей из опухолевых клеток с использованием ПОБ является перспективным для получения систем для тестирования противоопухолевых препаратов. Более полное понимание механизмов будет достигнуто посредством анализа экспрессии различных транскрипционных факторов и в ходе масштабирования процесса до культивирования в большем объёме с постоянной циркуляцией питательной среды.

Работа получила финансовую поддержку РФФИ мк № 18-29-09099.

БТ/БИ5. Получение и тестирование оптимизированной версии генетически-кодируемого флуоресцентного биосенсора для визуализации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных в живых системах

Р.И. Раевский (riraevsky@gmail.com)[1,2], А.И. Костюк[1,3], В.В. Белоусов[1,3,4], Д.С. Билан[1,3]

[1]Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

[3]Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова

[4]Institute for Cardiovascular Physiology, Georg August University Göttingen, D-37073 Göttingen, Germany

Введение. (Псевдо)гипогалогенные кислоты являются важным агентом в физиологии воспаления человека, и нарушения в системах их синтеза ассоциированы со множеством патологий (атеросклероз, астма, ревматоидный артрит). Из-за малого времени жизни этой группы веществ применение традиционных биохимических подходов в изучении их биологической роли не представляется возможным. В нашей лаборатории разработан биосенсор для детекции гипохлорит-анионов Hypochrates (hypochlorite ratiometric sensor) на основе белка NemR и кругового пермутанта YFP [1]. Hypocrates демонстрирует рациометрический ответ на (псевдо)гипогалогенные кислоты и их производные, однако, обладает низкой амплитудой ответа. Работа посвящена получению улучшенной версии Hypocrates и оптимизации протоколов скрининга данных типов сенсоров.

Материалы и методы. Для получения библиотек случайного мутагенеза был использован протокол error-prone PCR. Экспрессию и скрининг клонов проводили в клетках *E.coli* XL1-Blue. Отбор клонов по интенсивности флуоресценции проводили при помощи флуоресцентного бинокуляра Olympus USSZX12. Для скрининга бактериальных клонов и очищенных белков по ответу на целевой аналит использовали спектрофлуориметр Varian Cary Eclipse и микропланшетный ридер TECAN Infinite®200PRO.

Результаты. В результате случайного мутагенеза удалось отобрать версии биосенсора с увеличенной амплитудой ответа. При окислении этих версий гипохлоританионом сигнал в бактериальной суспензии изменяется в 2.1, 2.4, 3.5 раз. Максимальная амплитуда ответа исходной версии составляет 1,7. Для клона с наибольшим изменением сигнала показана замена Y143C. В рамках работы мы также разработали протокол для высокопроизводительного скрининга библиотек клонов Hypocrates.

Выводы. Получена версия Hypocrates с двукратным увеличением амплитуды ответа, в настоящее время проводится проверка специфичности в отношении (псевдо) гипогалогенных кислот и их производных. Был создан протокол для высокопроизводительного скрининга библиотек клонов Hypocrates.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-20032.

Список литературы.

1. Kostyuk et al., SPP1710 Conference, Sant Feliu de Guixols, Spain (2019)

БТ/БИ6. Получение и изучение свойств генокодируемого флуоресцентного хонготоксина - лиганда калиевых Kv1-каналов

М.А. Скутель (mskutel@yandex.ru)[1], А.В. Феофанов[1], О.В. Некрасова[2]

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

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

Введение. Нарушение в работе калиевых потенциал-зависимых каналов Kv1 приводит к ряду серьёзных неврологических, аутоиммунных и кардиологических заболеваний, поэтому изучение модуляторов активности этих каналов имеет большое фармакологическое значение [1]. Цель данной работы- получение химерного белка хонготоксина 1 слитого с флуоресцентным белком RFP (RFP-HgTx1), изучение его взаимодействия с рекомбинантными каналами KcsA-Kv1 и применимости в качестве инструмента для определения аффинности лигандов этих каналов.

Материалы и методы. Для экспрессии RFP-HgTx1 в клетках *E.coli* использовали плазмиду pET (Novagen). RFP-HgTx1 очищали с помощью Ni-аффинной хроматографии. Сферопласты клеток *E. coli*, на мембране которых экспонированы каналы KcsA-Kv1, получали по опубликованным протоколам [2]. Для определения констант взаимодействия RFP-HgTx1 с каналами методом конфокальной микроскопии измеряли интенсивность флуоресценции на поверхности сферопластов после инкубации их с RFP-HgTx1 разной концентрации [3]. Определение констант связывания лигандов осуществляли методом конкурентного ингибирования связывания RFP-HgTx1 немечеными лигандами [3].

Результаты. Показано, что аффинность RFP-HgTx1 к каналу KcsA-Kv1.3 выше, чем к KcsA-Kv1.1. Для обоих комплексов константа диссоциации находится в наномолярном диапазоне, и RFP-HgTx1 применим для оценки взаимодействия с Kv1-каналами других высокоаффинных лигандов. В настоящей работе были исследованы ChTx, HgTx1, AgTx2, относящиеся к разным группам блокаторов Kv1 - каналов. Согласно оценки наибольшую (субнаномолярную) аффинность среди исследованных токсинов имеет AgTx2, а ChTx и HgTx обладают наномолярной аффинностью.

Выводы. В ходе работы выделен, очищен и охарактеризован по аффинности рекомбинантный RFP-HgTx1. С его помощью определены константы взаимодействия с каналами KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv 1.3 других лигандов: ChTx, HgTx1, AgTx2.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда №19-74-30014.

Список литературы.

1. H. Wulff et al., Nat. Rev. Drug Discov. 8, 982–1001 (2009).
2. O.V. Nekrasova et al., J. Neuroimmune Pharmacol. 4, 83–91 (2009).
3. K.S. Kudryashova et al., Anal. Bioanal. Chem. 405, 2379-2389 (2013).

БТ/БИ7. Продукты распада матриксов на основе пористых микросфер из поли-3-оксибутирата, как фактор влияющий на рост и дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток

Д.В. Чеснокова (chdaryana@gmail.com)[1], И.И. Жаркова[1], А.П. Бонарцев[1,2]
[1]Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2]Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

Введение. Поли-3-оксибутират (ПОБ) обладает высокой биосовместимостью и инициирует дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в остеогенном направлении [1]. Было показано, что топография поверхности играет важную роль в дифференцировке (МСК) [2-3], однако, сложная микроструктура поверхности также определяет скорость распада полимера. Целью данной работы является исследование продуктов распада матриксов разной формы в условиях, стандартных для клеточной культивации, поскольку наночастицы полимера могут захватываться клетками и влиять на их рост и дифференцировку [4].

Материалы и методы. Для данного исследования было изготовлено два типа матриксов из из пористых микросфер со средним диаметром 170 и 600 мкм, иммобилизованных на полимерной плёнке. В качестве контроля использовалась пленка из ПОБ. Образцы матриксов помещали в среду DMEM и оставляли инкубироваться при температуре 37˚С. Размеры присутствующих в образцах среды частиц анализировали с помощью Zetasizer Nano ZS. В МСК, выращенных на таких матриксах в стандартной и остеогенной среде, измеряли активность щелочной фосфатазы.

Результаты. Во всех образцах среды присутствуют частицы диаметром менее 1 нм и более 1 мкм. В образцах с матриксом из больших сфер присутствуют частицы диаметром около 120 нм. На шестые сутки во всех образцах увеличивается доля частиц меньше нанометра, в образцах кондиционированной среды из-под матриксов дополнительно появляются частицы диаметром около 5 нм. Активность щелочной фосфатазы в МСК, растущих на матриксах, не отличается от контроля в остеогенной среде.

Выводы. В образцах с кондиционированной средой из-под матриксов и пленки наблюдаются различающиеся по размерам продукты распада. В МСК, растущих на матриксах подавляется остеодифференцировка. В дальнейшем мы планируем проверить цитотоксичность и остеогенное действие полученной кондиционированной среды.

Работа получила финансовую поддержку РФФИ мк № 18-29-09099 и выполнена с использованием оборудования центров коллективного пользования МГУ.

Список литературы.

1. Voinova V., Bonartseva G., Bonartsev A. Effect of poly (3-hydroxyalkanoates) as natural polymers on mesenchymal stem cells //World journal of stem cells. – 2019. – Т. 11. – №. 10. – С. 764.
2. Bonartsev A. P. et al. Poly (3-hydroxybutyrate)/poly (ethylene glycol) scaffolds with different microstructure: the effect on growth of mesenchymal stem cells //3 Biotech. – 2018. – Т. 8. – №. 8. – С. 328.
3. Criscenti G. et al. 3D screening device for the evaluation of cell response to different electrospun microtopographies //Acta biomaterialia. – 2017. – Т. 55. – С. 310-322.
4. Newman J. C., Verdin E. β-Hydroxybutyrate: a signaling metabolite //Annual review of nutrition. – 2017. – Т. 37. – С. 51-76.

Содержание

Схема здания биологического факультета **10**

Секция «Доклады» **11**

Д1. Дегидрогеназа D-аминокислот из *Pseudomonas aeruginosa* как инструмент для изменения внутриклеточной концентрации пирувата 11

Д2. Формирование наивных репертуаров CD4+ конвенциональных и регуляторных Т-клеток в условиях селекции на полиморфных вариантах MHC-II 12

Д4. Роль жидко-жидкостного разделения фаз в установлении и поддержании трёхмерной структуры хроматина 14

Д5. Флуорогенный биосенсор для детекции пероксида водорода 15

Д6. Мутация в гене HTT влияет на уровень экспрессии цитоскелетных белков, организацию цитоскелета и подвижность культивируемых кожных фибробластов пациентов с болезнью Гентингтона 16

Д7. Оценка терапевтического действия IgA антител в мышиной модели колоректального рака 17

Секция «Биохимия» **18**

Б1. Разработка модельной системы для исследования уровня протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A при гипертрофии миокарда 18

Б2. Определение содержания изоформ SAA1 и SAA2 человека в образцах плазмы крови методом иммуноблоттинга 19

Б3. Индуцированная гипохлоритом окислительная модификация фибриногена 19

Б4. Олиго-1,6-гликозидаза *Exiguobacterium sibiricum.* Сайт-направленный мутагенез для увеличения термостабильности 20

Б5. Кристаллизация и структурный анализ мутантных форм тиоцианатдегидрогеназы из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* с заменами K281A и K264A, K267A 21

Б6. Гипохлорит-индуцированная окислительная модификация плазминогена: структурно-функциональные нарушения 22

Б7. Взаимодействие противоопухолевого соединения галетерона с цитохромом P450 21A2 (CYP21A2) 23

Б8. Получение и исследование свойств рекомбинантного химерного белка, содержащего сердечную изоформу тропонина I и тропонина C человека 24

Б9. Влияние C-конца ε-субъединицы на активность АТФ-синтазы *Bacillus subtilis* 25

Б10. Исследование влияния одиночных замен в интерфейсе белка 14-3-3ζ на некоторые его характеристики 25

Б11. Получение рекомбинантных сердечных изоформ человеческих тропонинов I и T в бактериальной системе экспрессии и реконструкция тропонинового комплекса на их основе 26

Б12. Модуляция системы комплемента человека β-шпилечными антимикробными пептидами 27

Б13. Получение рекомбинантного GFAP крысы и изучение его иммунохимических свойств 28

Б14. Функциональная значимость неупорядоченных участков в структуре тропомиозина 29

Б15. Эволюция белков нуклеоплазминового семейства 29

Б16. Взаимодействие высокоаффинного аптамера G7-4 с гемагглютининами вируса гриппа A 30

Б17. Получение рекомбинантного N-концевого фрагмента IGFBP-4 для исследования уровня протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A в кардиомиоцитах крысы.....31

Секция «Молекулярная и клеточная биология» 33

М1. Тепловой стресс ингибирует процессинг фрагментов Оказаки в клетках млекопитающих.....33

М2. Сайт связывания ppGpp РНК-полимеразы *Escherichia coli,* определяющий сопряжение транскрипции с репарацией ДНК.....34

М3. Димерные ДНК-аптамеры к гемагглютинину вируса гриппа 34

М4. Клеточная модель для изучения динамики локусов MYC и IGH в живой клетке.....35

М5. Различия в метаболизме родаминовых красителей в нормальных и опухолевых клетках.....36

М6. Роль TNFR2 сигнального пути в поддержании гомеостаза В-клеток.....37

М7. Дифференцировочный потенциал иммортализованных клеточных линий снижен в сравнении с первичными культурами клеток человека 38

М8. Сравнительная динамика канонических нуклеосом и нуклеосом с вариантной формой гистона H2A.....39

М9. Влияние уровня поли(АДФ-рибоза)полимеразы 1 на статус системы эксцизионной репарации оснований ДНК в клетках HEK-293T.....40

М10. Использование омиксных технологий для исследования свойств мезенхимальных стромальных клеток костного мозга при диффузной В-крупноклеточной лимфоме....41

М11. Установление механизмов регуляции остеогенной дифференцировки стволовых клеток компонентами внеклеточного матрикса, продуцируемыми мезенхимными стромальными клетками.....42

М12. Организация сигнального пути TGF-beta и его активность в развитии губки *Halisarca dujardini* 43

М13. Исследование роли MTS1338, малой РНК *Mycobacterium tuberculosis*, во взаимодействии внутриклеточного патогена с клеткой хозяина.....43

М14. Роль повторов мотива EBS в регуляции EIN3-зависимого ответа на этилен у *Arabidopsis thaliana L* 44

М15. Разработка методов изучения роли белков когезинового комплекса в регуляции сегрегации хроматид в интерфазе 45

М16. Клеточные характеристики формирования регенеративной мембраны у известковой губки *Leucosolenia cf. variabilis* 46

М17. Анализ изменения экспрессии генов при действии уабаина в культуре нейронов, полученных из ИПСК человека.....47

М18. Уабаин и маринобуфагенин: возможные физиологические эффекты на клетки эпителия и эндотелия человека.....48

М19. Белок Non3 (Novel Nucleolar protein 3) необходим для формирования прицентромерного гетерохроматина *Drosophila melanogaster* 49

Секция «Физиология и медицинская биохимия».....50

Ф1. NBCe1 как мишень действия пролактина в модели холестаза беременных у крыс....50

Ф2. Новые ингибиторы протеинкиназ нарушают сплайсинг РНК и вызывают гибель нейросфер глиобластомы.....50

Ф3. Катехин увеличивает активность ангиотензинпревращающего фермента в аорте крыс.....51

Ф4. Изменения биохимических показателей основных метаболических обменов в патологических процессах печени 52

Ф5. Эндокринный статус белых крыс при однократном введении этанола и морфолина. Сравнительная оценка....53

Ф6. Изучение нейропротекторных свойств внеклеточных везикул мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток 54

Ф7. Уровень экспрессии генов toll-подобных рецепторов изменяется в структурах мозга крыс в период отмены алкоголя 55

Ф8. Кратковременное и долговременное влияние ICV введения уабаина на дофаминовую регуляцию физиологической активности у мышей линии 56

Ф9. Изменение экспрессии гена противовоспалительного цитокина интерлейкина-10 и его белка на разных этапах нейродегенерации гиппокампа крыс, вызванной интоксикацией хлоридом триметилолова....57

Ф10. Сравнение миелоидных и лимфоидных клеток иммунного инфильтрата в различных инокулированных опухолях лабораторных мышей....57

Ф11. Влияние астаксантина на функциональное состояние митохондрий сердца крысы при острой сердечной недостаточности 58

Ф12. Обоснования выбора методов ИФА и ПЦР в диагностике вирусных инфекций....59

Ф13. Тромбин и BDNF регулируют размер кванта в новообразованных моторных синапсах мыши 60

Ф14. Цитотоксические эффекты новых производных секоизоларицирезинола диглюкозида в клетках рака молочной железы....61

Ф16. Хорионический гонадотропин в регуляции дифференцировки Т-хелперов 17-го типа 62

Ф17. Влияние анандамида на спонтанную секрецию ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах мыши 63

Ф18. Нейропротекторная активность салицилкарнозина в модели ишемии на первичной культуре клеток больших полушарий головного мозга крысы 64

Секция Биоинженерии и биотехнологии 65

БТ/БИ1. Сравнение проницаемости бутил(трифенил)фосфония и его аналогов через бислойные липидные мембраны с их накоплением в митохондриях печени крысы....65

БТ/БИ2. Эндолизины бактериофагов грамотрицательных бактерий LysAm24, LysAp22, LysECD7, LysSi3 и LysSt11 проявляют выраженную бактерицидную активность в отношении биопленок *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae* 66

БТ/БИ3. Новый штамм каротиногенной микроводоросли *Bracteacoccus aggregatus* и его биотехнологические характеристики. 67

БТ/БИ4. Экспериментальная модель роста опухолевых клеток на микросферах из поли-3-оксибутирата....68

БТ/БИ5. Получение и тестирование оптимизированной версии генетически-кодируемого флуоресцентного биосенсора для визуализации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных в живых системах....69

БТ/БИ6. Получение и изучение свойств генокодируемого флуоресцентного хонготоксина - лиганда калиевых Kv1-каналов 70

БТ/БИ7. Продукты распада матриксов на основе пористых микросфер из поли-3-оксибутирата, как фактор влияющий на рост и дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток 71

Научное издание

II межвузовская студенческая конференция
СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2020

09-10 февраля 2020 г.

Материалы конференции

Составление и верстка: В.М. Шатов
Дизайн обложки: В.К. Киреева

Формат 90x60/16
Печать цифровая
Усл. печ. листов 4,75
Тираж 140 экз.
Шрифт PT Serif
Изд. Биологический факультет МГУ
Заказ 3
Подп. в печать 30.01.2020