РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СО РАН
АО «ТЕХНОПАРК НОВОСИБИРСКОГО АКАДЕМГОРОДКА»



БИОТЕХНОЛОГИЯ - медицине будущего

Всероссийская мультиконференция с международным участием

Новосибирск, 29 июня-2 июля 2019 г.

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

НОВОСИБИРСК
2019

УДК 577.1
ББК 28.072

Биотехнология – медицине будущего. Материалы всероссийской мультиконференции с международным участием. Новосибирск, 29 июня-2 июля 2019 г. – Новосибирск. ООО «Офсет-ТМ». 2019. – 256 с.

Сборник содержит материалы научной мультиконференции «Биотехнология – медицине будущего».

Сборник предназначен для широкого круга биохимиков, биофизиков, специалистов в биоорганической химии, молекулярной и клеточной биологии, биотехнологии.

ISBN: 978-5-85957-150-6

© Коллектив авторов, 2019
© ИХБФМ СО РАН, 2019

Научный организационный комитет:

Председатель академик РАН Власов В.В.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
академик РАН Габибов А.Г.	Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва
чл.-корр. РАН Пышный Д.В.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
чл.-корр. РАН Лаврик О.И.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
чл.-корр. РАН Нетесов С.В.	Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск
Даниленко В.Н.	Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва
Рихтер В.А.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Зенкова М.А.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Тикунова Н.В.	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Рабочий организационный комитет:

к.х.н. Пестряков П.Е., к.х.н. Коваль В.В., Зуева А.И.

Дорогие друзья, коллеги!

Всероссийская мультиконференция «Биотехнология – медицине будущего» приурочена к 35-летию Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, который является одним из международных лидеров в создании ген-направленных биологически активных веществ, разработке биотехнологических подходов в генотерапии, изучении физико-химических основ процессов передачи и сохранения наследственной информации.

Институт начал свою историю с 1 апреля 1984 года как Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР. В 2003 г. в связи с расширением направлений исследований Институт переименован в Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Директором-организатором института был академик Кнорре Дмитрий Георгиевич.

В рамках мультиконференции «Биотехнология – медицине будущего» планируется обсудить фундаментальные научные и научно-практические вопросы, связанные с развитием подходов к дизайну интеллектуальных материалов – биологических молекул, молекулярных устройств, модифицированных микроорганизмов и клеток, а также их использованием в актуальных и перспективных биомедицинских приложениях, которые имеют прямое отношение к персонализированной и регенеративной медицине и терапии социально значимых заболеваний. Участники симпозиумов планируют обсудить возможности совместного применения новых клеточных технологий, геномной инженерии в неврологии, онкологии и других областях практической медицины

В последние годы в развитых странах мира междисциплинарные исследования привели к получению значимых научных результатов в области наук о жизни и появлению методов и приборов, которые позволили создавать перспективные средства терапии, материалы и устройства на базе биологических молекул. В этой области события развиваются все более стремительно, открывая новые возможности для создания новых технологий, которые все в большей степени формируют облик медицины нового поколения. Адаптация технологий биоорганической химии, физико-химической и молекулярной биологии для целей, решаемых синтетической биологией, открыла возможности создания сложных систем на основе биомолекул и их ассоциатов. Интерес к системам такого типа обусловлен высокой степенью их биосовместимости и возможностью направленного варьирования их функциональности, необходимой для достижения практически значимых свойств при использовании в биотехнологических и медицинских приложениях. Кроме того, особенностью “интеллектуальных” материалов, создаваемых методами синтетической биологии, является их

способность к высокоспецифичному «узнаванию» биологических мишеней и способность осуществлять воздействие на эти мишени в соответствии с запрограммированными свойствами.

Высокий биомедицинский потенциал вышеуказанных подходов заключается в возможности создания перспективных таргетных терапевтических препаратов на основе белков, нуклеиновых кислот и бактериофагов, разработке инструментария для генотерапии и геномного редактирования, позволяющего внедрение персонализированных подходов в медицине. Параллельно активные исследования в области молекулярной и клеточной биологии, иммунологии, современные подходы к анализу метагеномов дают возможность раскрыть основы патогенеза болезней и определяют эффективные мишени для применения терапевтических агентов нового типа. Таким образом междисциплинарные научные исследования позволяют приблизить решение одной из приоритетных задач, озвученных в Стратегии научно-технологического развития РФ – "переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)".

Значительную часть выступлений на конференции составят доклады авторитетных российских и зарубежных ученых, представляющих такие именитые научные организации, как Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институт молекулярной генетики РАН, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН и др. Опыт научного диалога со специалистами такого уровня в области медицинской биологии, микробиологии, иммунологии, регенеративной медицины очень важен для научных работ молодых ученых, для этого в рамках конференции запланирована к проведению отдельная сессия и конкурс работ молодых ученых, аспирантов, магистрантов, студентов.

Основными организаторами мероприятия выступают Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН совместно с Новосибирским национальным исследовательским государственным университетом и Новосибирским Технопарком.

Мультиконференция «Биотехнология – медицине будущего» включает в себя несколько симпозиумов, объединенных общей идеей:

- Школа-конференция «Терапевтические нуклеиновые кислоты» с участием молодых ученых.
- Симпозиум «Биомедицинские технологии».
- Симпозиум «Бактериофаги. Управление микробиотой».
- Симпозиум «Структурная биология: перспективы проекта СКИФ».

ОРГАНИЗАТОРЫ МУЛЬТИКОНФЕРЕНЦИИ:

Новосибирский государственный университет
*НАСТОЯЩАЯ НАУКА

НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НГУ)

ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СО РАН (ИХБФМ СО РАН)

академпарк
Технопарк Новосибирского Академгородка

ТЕХНОПАРК НОВОСИБИРСКОГО АКАДЕМГОРОДКА (АКАДЕМПАРК)

*НГУ В ЦИФРАХ И ФАКТАХ

7200 СТУДЕНТОВ

1400 ИНОСТРАННЫХ СТУДЕНТОВ из 57 стран мира



6 факультетов

3 института

2500 ПРЕПОДАВАТЕЛЕЙ

880 ДОЦЕНТОВ

570 ПРОФЕССОРОВ с докторской степенью

73 ЧЛЕНА РАН

БОЛЕЕ **120** СТРАН

охват массовых открытых онлайн-курсов на Coursera

141 ПАРТНЕРСКИХ УНИВЕРСИТЕТА в 27 странах

СОВМЕСТНЫЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ПРОГРАММЫ С КОМПАНИЯМИ

Baker Huges, OSCiAl, Parallels, Intel, Яндекс, 2GIS, Академпарк, Биотехнопарк, Сбербанк Технологии

35 НАУЧНЫХ ИНСТИТУТОВ-ПАРТНЕРОВ в Академгородке

139 ВЕДУЩИХ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ

H>20

ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЕ ГРУППЫ НГУ УЧАСТВУЮТ В **38** МЕЖДУНАРОДНЫХ КОЛЛАБОРАЦИЯХ

140 ЛАБОРАТОРИЙ

6 ЗЕРКАЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ

5-100 ОДИН ИЗ ЛИДЕРОВ ПРОЕКТА 5-100 – повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов

ТОП-100 ПО ФИЗИЧЕСКИМ НАУКАМ

QS University Rankings

ТОП-500 АКАДЕМИЧЕСКОГО РЕЙТИНГА УНИВЕРСИТЕТОВ МИРА

3 место среди российских университетов

12 МЕСТО

QS UNIVERSITY RANKINGS BRICS

2 МЕСТО

QS UNIVERSITY RANKINGS EMERGING EUROPE AND CENTRAL ASIA 2015

68 МЕСТО

QS UNIVERSITY RANKINGS NATURAL SCIENCES

190 МЕСТО

GOOGLE SCHOLAR CITATIONS

244 МЕСТО

QS UNIVERSITY RANKINGS

из 20 тысяч университетов мира

N*

СПОНСОРЫ

ООО «Компания Хеликон»
121374, г. Москва, Кутузовский проспект, д. 88
Тел.: 8 800 770 71 21 (бесплатно для всей России)
+7 499 705 50 50 (в Москве)
Эл. почта: mail@helicon.ru
Сайт: www.helicon.ru

Eppendorf Russia
ООО «Эппендорф Раша»
115114, г. Москва, Дербеневская наб., 11
офис Б301
Тел.: +7 (495) 743 51 23
Эл. почта: info@eppendorf.ru
Сайт: www.eppendorf.ru

ООО «Диаэм»/Dia-M LLC
129345, г. Москва, ул. Магаданская, д. 7 к. 3
Тел.: (495)745-05-08
Факс (495)745-05-09
Эл. почта: info@dia-m.ru
Сайт: www.dia-m.ru

ООО «Химмед Сибирь»
Россия, 630090, г. Новосибирск,
проспект Лаврентьева, д. 6/1
Тел.: (383) 227-99-74, 335-61-08, +7-923-227-99-74
Эл. почта: sibir@chimmed.ru
Сайт: www.chimmed.ru

ООО Биосан»/ООО «Биолабмикс»
630090, г. Новосибирск, ул. Инженерная, 28
Тел.: (383) 363-51-91
Эл. почта: mail@biosan-nsk.ru, sales@biolabmix.ru
Сайт: www.biosan-nsk.ru, www.biolabmix.ru



Merck
115054, г. Москва, ул. Валовая, д. 35
Тел.: +7(495) 937-33-04, 8-800-100-7425
Эл. почта: mm.russia@merckgroup.com / ruorder@merckgroup.com
Сайт: merckmillipore.com / sigmaaldrich.com



АО «НПО «Микроген»
127473, г. Москва, 2-й Волконский переулок, д. 10
Тел: +7 (495) 790-77-73
Тел. для СМИ: +7 (495) 790-77-73 доб. 3601
Факс: +7 (495) 790-77-73
Эл. почта: info@microgen.ru
Сайт: www.microgen.ru



ООО «Техноинфо»
г. Москва, Кутузовский проспект, 9/2а, офис 77
Тел.: +7 499 270 66 26
Эл. почта: sales@technoinfo.ru
Сайт: www.technoinfo.ru



ООО «БИОССЕТ»
630090, Новосибирск, ул. Инженерная, 28
тел./факс: (383)363-93-81,
Эл. почта: info@biosset.com
Сайт: www.biosset.com



ООО “РЕОЛГРЕЙД СЕРВИС”
Россия, 630559 Новосибирская область,
Наукоград Кольцово,
ул. Технопарковая, 5 офис 11
Тел/факс: (383) 347-44-54; 347-67-75
Эл. почта: reolgrade@reolgrade.ru
Сайт: reolgrade.ru

helicon

КОМПАНИЯ ХЕЛИКОН
отечественный производитель
лабораторного оборудования

опыт
с 1997
года

НАПРАВЛЕНИЯ РАБОТЫ

- Молекулярная и клеточная биология
- Клиническая диагностика
- Криминалистика
- Биоиндустрия
- Ветеринария и пищевая безопасность



Центральный офис:
121374 г. Москва, Кутузовский проспект, д. 88
Тел. 8 (800) 770-71-21 Факс +7 (495) 930-00-84
mail@helicon.ru

www.helicon.ru

Представительство в Сибирском регионе:
630090 г. Новосибирск, ул. Инженерная, 28
Тел. +7 (383) 207-84-85, novosibirsk@helicon.ru

Представительство в Северо-Западном Регионе:
195220 г. Санкт-Петербург, ул. Гжатская д. 22 корп. 1
Тел. +7 (812) 244-85-52, spb@helicon.ru

Представительство в Приволжском регионе:
420021 г. Казань, ул. Татарстан, д. 14/59, оф. 201
Тел. +7 (843) 202-33-37, volga@helicon.ru

Представительство в Южном регионе:
344116 г. Ростов-на-Дону, ул. 2-ая Володарская, д. 76/23а
Тел. +7 (863) 294-87-66, rostov@helicon.ru

Eppendorf – ведущий производитель высококачественного лабораторного оборудования и расходных материалов для работы с жидкостями, пробами и клетками. Продукция Eppendorf используется в лабораториях различных профилей: академических, отраслевых научно-исследовательских, клинико-диагностических, экологических, криминалистических, а также в фармацевтической, биотехнологической, химической и пищевой промышленности. Головной офис компании находится в Гамбурге, Германия. Производственные мощности расположены в Гамбурге, Ольденбурге и Лейпциге, в также в Великобритании (Малдон) и США (Энфилд).

Продукция Eppendorf представлена в трех направлениях:



LIQUID HANDLING

Механические и электронные дозаторы и диспенсеры, наконечники для дозаторов, бутылочные дозаторы, цифровые бюретки, станции автоматического дозирования.



SAMPLE HANDLING

Миксеры и термомиксеры, пробирки и планшеты, центрифуги и роторы, амплификаторы и расходные материалы для ПЦР, низкотемпературные морозильные камеры.



CELL HANDLING

Фотометры, спектрофотометры, микроманипуляторы, микроинъекторы и вспомогательное оборудование, расходные материалы для культивирования клеток и микроскопии, CO2-инкубаторы, шейкеры, биореакторы, ферментеры.

На территории Российской Федерации Eppendorf AG представлен
ООО «Эппендорф Раша»:
Россия 115114, Москва, Дербеневская наб., 11, офис Б301
+7 (495) 743 51 23,
info@eppendorf.ru,
www.eppendorf.ru

Мы делаем ПЦР проще и удобнее

Группа компаний Биолабмикс и Биосан - разработчики новых технологий и производители продуктов для исследовательских работ в области молекулярной биологии, биохимии и генетической инженерии:



Наборы и смеси для ПЦР

- Классическая ПЦР
- ПЦР с флуоресцентным красителем SYBR Green I
- ПЦР с флуоресцентными зондами
- ПЦР длинных фрагментов
- Обратная транскрипция
- ОТ-ПЦР

Маркеры молекулярных весов ДНК и буферы для нанесения на гель

- ДНК маркер «Step 50 plus»
- ДНК маркер «Step 100» и «Step 100 Long»
- ДНК маркер «Start 250»
- ДНК маркер «Sky-High»
- Набор ДНК маркеров «100b – 10kb»
- Буфер для нанесения образцов РНК на гель «ФриК»
- 4-кратный буфер для хранения и нанесения образцов ДНК «БиК»
- 6-кратный буфер нанесения и хранения образцов ДНК «ТриК»

Реактивы и наборы для выделения НК и белков

- Наборы для выделения ДНК из клеток,тканей и из реакционных смесей.
- Наборы для выделения суммарной РНК и микроРНК клеток и тканей и из эукариотических и бактериальных клеток
- Реактивы для выделения НК и белков «Лира» и «Лира+».

Также мы оказываем высокотехнологичные услуги

- Анализ образцов методом ПЦР в режиме реального времени.
- Анализ образцов методом классической ПЦР
- Дизайн праймеров на РНК/ДНК-мишень
- Разработка систем для генотипирования
- Синтез олигонуклеотидов и зондов для ПЦР

Продукция ООО «Биосан»

- Стандартные и модифицированные нуклеотиды
- Taq ДНК-полимераза и Hot Start Taq ДНК полимераза
- Ревертаза MMLV-RH-
- Bst I ДНК полимераза
- ДНК-зависимая РНК-полимераза T7
- T4 ДНК-лигаза
- T4 Полинуклеотид киназа
- Урацил-ДНК-гликозилаза
- ДНК pUC19

Контакты:

ООО «Биолабмикс» (www.biolabmix.ru)
ООО «Биосан» (www.biosan-nsk.ru)
Адрес: 630090 г.Новосибирск, ул.Инженерная,28
E-mail: sales@biolabmix.ru , mail@biosan-nsk.ru
Тел: +7 (383) 363-51-91

Наши дистрибьюторы:

Компания Хеликон

121374 Москва, Кутузовский проспект, дом 88
Единый телефон:
8 (800) 770-71-21(звонок по России бесплатный)
E-mail: mail@helicon.ru
Телефоны в Москве:
+7 (499) 705-50-50Факс: +7 (499) 704-49-59
+7 (499) 769-51-60

ООО «Компания Пущинские лаборатории»

142290, Московская область, г.Пущино,
микрорайон «Д», д.20А, пом. 4Б
Телефоны: +7 (499) 110-03-07, +7 (4967) 318-707
Офис в Москве
Москва, Ступинский проезд, д.1, строение 29
Телефон: +7 (499) 110-59-07
E-mail: info@laboratorii.com

Биохимические реактивы, оборудование и расходные материалы Life Sciences

ХИММЕД
www.chimmed.ru

Исследования в биотехнологии:

- клеточные культуры
- секвенирование генома
- профилирование экспрессии РНК
- кПЦР
- многопараметрический скрининг
- проточная цитометрия
- вестерн-/иммуноблоттинг
- профилирование киназ





ThermoFisher SCIENTIFIC
invitrogen
thermo scientific
gibco
applied biosystems
ion torrent
QIAGEN
NEOFROXX
Roche
Avanti
Promega
abcam

Enzo Life Sciences
bio-techne
NEW ENGLAND BioLabs Inc.
R&D SYSTEMS a bio-techne brand
TOCRIS a bio-techne brand
MERCK
NOVUS BIOLOGICALS a bio-techne brand
CORNING
nunc
PEPROTECH
Abnova
HIMEDIA
AbD Serotec A Bio-Rad Company

CYGNUS TECHNOLOGIES
Novagen
BostonBiochem
novabiochem
Miltenyi Biotec
Fitzgerald
MyBioSource.com
biowest

Мы можем предоставить демоверсии приборов в вашу лабораторию!

Москва, 115230, Каширское шоссе, д. 9, корп. 3. Тел.: +7 (495) 728 4192, e-mail: bio@chimmed.ru
Санкт-Петербург, 195248, просп. Энергетиков, д. 19, оф. 314. Тел.: +7 (812) 605 0061, e-mail: spb@chimmed.ru
Казань, 420081, ул. Седова, д. 22. Тел.: +7 (843) 273 6761, 272 9786, e-mail: kazan@chimmed.ru
Новосибирск, 630090, просп. Академика Лаврентьева, 6/1. Тел.: +7 (383) 335 6108, e-mail: sibir@chimmed.ru

Биоимиджинг

оборудование для работы с живыми клетками

MERCK

ThermoFisher SCIENTIFIC

Микроперфузионная система Onix-2, Merck

Onix-2 позволяет создавать **имитацию условий *in vivo*** за счёт воспроизведения точных условий микроокружения клеток, аналогичных живому организму, а также изучать влияние микроокружения клеток на их физико-химические показатели в режиме реального времени.

Примеры использования: создание хемоградиента и изучение хемотаксиса иммунокомпетентных клеток, изучение онкогенеза в динамике, изучение механизмов сфероидообразования в режиме реального времени, с возможностью изменения параметров культивирования в процессе постановки эксперимента;

- до 4 независимых экспериментов параллельно;
- отсутствие механического воздействия на клетки;
- высокоточный контроль скорости потока среды, температуры и газового состава в динамике;
- совместимость с любым стандартным инвертированным микроскопом.



Система визуализации EVOS FL Auto 2 с инкубатором, Thermo Fisher

EVOS FL обеспечивает **максимально автоматизированное решение длительных (круглосуточных) экспериментов** с клеточными культурами в автономном режиме и возможностью сканирования и последующей сшивкой изображения.
Примеры применения: изучение механизмов репарации тканей и онкогенеза в динамике, анализ гистологических срезов в автоматическом режиме.

- Многопозиционное сканирование образцов; многоуровневое наложение изображений (Z-stacking);
- интервальная съёмка и сшивка изображений;
- светодиодные источники света и светофильтры с повышенным сроком эксплуатации;
- до 4 каналов по выбору (УФ, синий, зелёный, жёлтый, оранжевый, красный, БИК);
- монохромная и цветная камеры.



Система высокопроизводительного клеточного скрининга CellInsight CX7 , Thermo Fisher

CellInsight CX7 — уникальная система **высокопроизводительного скрининга клеточных культур** с высоким разрешением **—** позволяет визуализировать большое количество объектов в автоматическом режиме и вести морфометрический и статистический анализ изображений, а так же поиск редких событий. Применение: изучение и статистическая обработка данных механизмов апоптоза, нейрогенеза, изучение влияния цитостатиков на культуры клеток и ткани; поиск единичных клеток с низким уровнем экспресии в сложном окружении.

- Функциональное ПО для поиска редких событий в автоматическом режиме;
- опциональный конфокальный модуль для получения изображений высокого разрешения;
- твердотельные светодиодные лазеры (УФ, синий, зелёный, жёлтый, оранжевый, красный, БИК);
- опциональная система поддержания жизнеспособности клеток (CO_2, температура, влажность).



ООО «Диаэм» www.dia-m.ru

Москва
ул. Магаданская, 7/3
тел./факс:
(495) 745-0508
sales@dia-m.ru

Новосибирск
пр. Акад. Лаврентьева, 6/1
тел./факс:
(383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Казань
ул. Парижской Коммуны, д. 6
тел/факс:
(843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

С.-Петербург
ул. Профессора Попова, 23
тел./факс:
(812) 372-6040
spb@dia-m.ru

Ростов-на-Дону
пер. Семашко, 114
тел/факс:
(863) 250-0006
rnd@dia-m.ru

Пермь
Представитель в УФО
тел./факс:
(342) 202-2239
perm@dia-m.ru

Воронеж
Представитель
тел./факс:
(473) 232-4412
voronezh@dia-m.ru

Армения
Представитель
тел.
094-01-01-73
armenia@dia-m.ru

TechnoInfo

sales@technoinfo.ru
www.technoinfo.ru
+7 (499) 270 66 26



Компания «Техноинфо» предлагает широкий спектр уникального оборудования для решения задач во многих областях науки. Будучи официальным представителем ведущих мировых производителей, «Техноинфо» также обеспечивает гарантийное и постгарантийное обслуживание установленных систем, обучение персонала и методическую поддержку пользователей.

Все сотрудники компании имеют профильное образование в своей области, поэтому мы подбираем наиболее подходящее решение в зависимости от потребностей пользователя. Большинство систем производится по индивидуальному заказу с учётом пожеланий клиента.

К нашим ключевым партнёрам относятся компании: Thermo Fisher Scientific (former FEI Company), Rigaku Oxford Diffraction, Applied Photophysics, Molecular Devices, IonTOF, Kratos, Keyence, Olympus, Xenocs, и другие.

TECHNOINFO

Molecular Devices · Xenocs · Rigaku oxford diffraction · ThermoFisher Scientific · Xenemetrix · Kratos Analytical · IonTOF

ООО «БИОССЕТ»

630090, Новосибирск, ул. Инженерная, 28
Тел./Факс: +7 (383) 363-9381 E-mail: info@biosset.com

ООО «БИОССЕТ» - инновационная научно-производственная компания, создана в 1994 году.

Миссией компании является повышение качества жизни людей за счет создания высокоэффективного оборудования для научных и практических целей на базе последних достижений молекулярной биологии и биотехнологий.

БИОССЕТ производит линейку автоматического оборудования для синтеза стандартных, вырожденных и модифицированных ДНК и РНК олигонуклеотидов, а также выполняет синтез олигонуклеотидов под заказ.

СИНТЕЗАТОР ДНК/РНК ASM-800T



- 8 олигонуклеотидов за 3,5 часа
- Масштаб синтеза: 40 нмоль-15 микромоль
- Высокоточная подача реактивов и встроенный термостат
- Мониторинг качества синтеза по тритилу
- Удобное и гибкое программное обеспечение
- Эффективный инструмент по доступной цене

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ СИНТЕЗАТОР ДНК/РНК ASM-2000



- 96 олигонуклеотидов за 4 часа
- Удобный формат синтеза: 96-луночный планшет или колонки
- Расширенный набор емкостей для мономеров
- Длина синтезируемых олигонуклеотидов - до 400 мономеров
- Мониторинг качества синтеза по тритилу
- Наличие автодозатора для переноса специальных реактивов
- Удобное и гибкое программное обеспечение
- Эффективный прибор по доступной цене

ПРЕПАРАТИВНЫЙ СИНТЕЗАТОР ДНК/РНК ASM-10



- Масштаб синтеза: 20 – 500 микромоль
- Вибрационное перемешивание реактивов в колонке
- Мониторинг качества синтеза по тритилу
- Автоматическое удаление олигонуклеотидов с полимера
- Контроль давления в газовой и жидкостной системах
- Удобное и гибкое программное обеспечение
- Эффективный прибор по доступной цене

MERCK

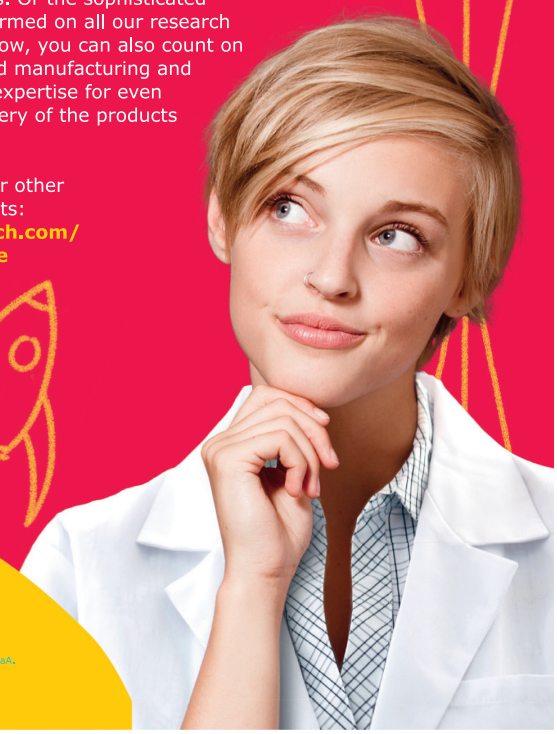
added [x]

The math is simple – our combined laboratory product range brings added value.

What do you get when you join two leading chemical companies into one? You get lots of pluses. Enjoy added safety, added expertise, and added consistency with all our solvents, inorganics, buffers, and detergents.

Some things will never change. Like the outstanding quality of our different purity grades. Or the sophisticated testing performed on all our research chemicals. Now, you can also count on our combined manufacturing and distribution expertise for even quicker delivery of the products you rely on.

Discover your other added benefits:
SigmaAldrich.com/added-value



LLC «Merck»
115054, Valovaya Str. 35, Moscow
Tel.: +7 (495) 937-33-04
E-mail: ruorder@merckgroup.com

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Merck and the vibrant M are trademarks of Merck KGaA. Copyright © 2017 Merck KGaA. All Rights Reserved.


БАКТЕРИОФАГИ
АКТУАЛЬНАЯ АЛЬТЕРНАТИВА АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ В УСЛОВИЯХ НАРАСТАЮЩЕЙ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
Многолетний клинический опыт лечения бактериальных инфекций в различных терапевтических областях
Показаны широкому кругу пациентов:
- беременные женщины
- дети от 0 месяцев
- пациенты с противопоказаниями к приему антибиотиков
Не угнетают нормальную флору кишечника
МИКРОГЕН
АО «НПО «Микроген»
127473, г. Москва, 2-й Волконский пер., д. 10
Тел.: 8 495 790 77 73
www.microgen.ru | www.bacteriofag.ru
Рег. удостоверения №№ ЛС-001361, Р N002560/01, ЛС-001297, Р N001977/01, ЛС-001998, ЛС-000624, ЛС-002206, Р N001973/01, ЛС-000700, ЛС-001049, ЛС-002031, Р N001974/01, ЛС-002033, ЛС-001998, Р N001975/01, Р N001976/01. Лицензия № 00313-ЛС от 16.01.2018.
Информационные материалы
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
ПЕРЕД ПРИМЕНЕНИЕМ ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ИНСТРУКЦИЕЙ

Реолгрейд сервис | *Лучшие решения для вашей лаборатории*

Поставка и обслуживание аналитического оборудования ведущих зарубежных производителей

Agilent Authorized Distributor

- *элементный анализ*
- *молекулярная спектрометрия*
- *газовая хроматография*
- *жидкостная хроматография*
- *масс-спектрометрия*

BECKMAN COULTER Life Sciences

- *центрифугирование*
- *проточная цитометрия*
- *лабораторная автоматизация*
- *производство и контроль качества*

RENISHAW apply innovation™

- *конфокальная Рамановская спектроскопия*

FRONTIER LAB

- *оборудование для пиролитической ГХ*



+7(383)347-44-54 **Наукоград Кольцово** www.reolgrade.ru

ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ
«ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ»
С УЧАСТИЕМ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

From chemical biology to medicine: functional bioconjugates of nucleic acids and peptides for future therapeutic applications

Bichenkova E.V.[1], Amirloo B.[1], Yousaf S.[1], Zenkova M.A.[2], Clarke D.J.[1], Patutina O.A.[2], Staroseletz Y.Y.[2], Miroshnichenko S.K.[2]

[1] *The University of Manchester, Manchester, United Kingdom*
[2] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia*

A major biomedical and pharmaceutical challenge is to provide quick, safe and effective treatment of various types of human pathophysiology. However, the lack of rapid, reliable and robust techniques for detection of disease biomarkers in biological samples represents the major bottleneck in screening of different pathological conditions in humans. The major disadvantages of the available diagnostic assays include the high production costs, inaccuracy, poor sensitivity and lack of reproducibility, which hamper the transition of biomedical diagnostics from specialised laboratories to clinical settings. Therefore, there is an urgent need for the development of novel advanced technologies allowing *in situ* nucleic acid detection for diagnostic purposes to improve health outcomes through early-stage diagnosis, more precise monitoring of therapeutic treatments and disease prognosis.

With regards to therapeutic treatments, traditional targeting of *downstream* pathways to treat the physiological abnormalities of disease states at the level of expressed proteins is proving increasingly difficult and often suffers from off-target effects and severe toxicity. A promising alternative to small molecular drugs is based on the RNA-targeting approaches, which offer the advantages of absolute selectivity, improved potency and reduced toxicity.

This talk is focused on the development of new strategies for development of novel molecular diagnostics and therapeutics based on the functional bioconjugates of nucleic acids and peptides.

Our research focus involves the design and fabrication of novel functional biomaterials with controlled chemical and biological properties, which can be used as a basis for development of clinically- and commercially-useful diagnostics, reagents and therapeutics in order to provide solutions to complex biological and biomedical grand challenges, unmet by conventional approaches. To achieve this, we work at the interface between synthetic, analytical, physical and computational chemistry with structural and chemical biology and use biologically-friendly building blocks (*e.g.* nucleic acids and peptides), which are bio-degradable and highly controllable in terms of their structure, properties and function. These recent advances open up new exciting avenues for development of a novel technological platform for rapid detection and effective treatment of human pathophysiology.

This work was supported by the grant of Russian Science Foundation 19-74-30011.

Fluorescent nucleic acid systems: design, construction, and application

Byeang Hyean Kim

Department of Chemistry, Division of Advanced Materials Science, Pohang University of Science and Technology (POSTECH), 77 Cheongam-Ro, Namgu, Pohang, Gyeongbuk, 37673, Korea

Fluorescent nucleic acid systems are widely applied in various fields, from fundamental biological probes to nano-construction [1]. Currently fluorescent oligonucleotides play an important role in analysis of the genetic information and biosensing such as single nucleotide polymorphism (SNP) typing. Fluorescent nucleic acid systems encompass an extensive and exciting research area in chemistry as well as in biotechnology and photophysics. We synthesized and investigated new fluorescent nucleic acid systems for probing SNPs [2], structural changes of DNA [3], G- quadruplexes [4], and i-motifs [5], and applied to various photophysical devices. We also investigated the fluorescent phenomena and structural aspects of pyrene modified oligodeoxyadenylates. The covalently linked pyrenes induced the formation of a self- assembled oligodeoxyadenylate duplex, namely, A-cluster with unique fluorescent behavior [6].

1. *Venkatesan N., Seo Y. J., Kim B. H. Quencher free Molecular Beacons: A New Strategy in Fluorescence based Nucleic Acids Analysis. // Chemical Society Reviews. - 2008. - V. 37. - P 648-663.*
2. *Hwang G. T., Seo Y. J., Kim B. H. A Highly Discriminating Quencher-Free Molecular Beacon for Probing DNA. // J. Am. Chem. Soc. - 2004. - V. 126. - P 6528-6529.*
3. *Kim K. T., Kim H. W., Moon D. H., Rhee Y. M., Kim B. H. DNS C: A Fluorescent, Environmentally Sensitive Cytidine Derivative for the Direct Detection of GGG Triad Sequences. // Org. Biomol. Chem. - 2013. - V. 11. - P 5605-5614.*
4. *(a) Takahashi S., Kim K. T., Podbevsek P., Plavec J., Kim B. H., Sugimoto N. Recovery of the Formation and Function of Oxidized G-Quadruplexes by a Pyrene-Modified Guanine Tract. // J. Am. Chem. Soc. - 2018. –V. 140. - P 5774-5783.*
5. *Park J. W., Seo Y. J., Kim B. H. Fluorescence modification of the AAAA (4A) loop: Toward a probe of the structural dynamics of the i-motif of the retinoblastoma gene. // Chem. Commun. - 2014. - V. 50. - P 52-54.*
6. *(a) Seo Y. J., Rhee H., Joo T., Kim B. H. Self-Duplex Formation of an APy-substituted Oligodeoxyadenylate and Its Unique Fluorescence. // J. Am. Chem. Soc. -2007. -V. 129. - P 5244-5247. (b) Ro J. J., Lee H. J., Kim B. H. PyA-Cluster system for detection and imaging of miRNAs in living cells through double-three-way junction formation. // Chem. Commun. - 2018. - V. 54. - P 7471-7474.*

This work was supported by the National Research Foundation (NRF) of Korea (2015M3A9B8029067, 2017R1A2A1A18071086). I am grateful to the colleagues named in the cited papers from my laboratory and would like to thank Professors N. Sugimoto, J. Plavec and their coworkers for the fruitful collaborations.

DNA aptamer incorporated surface sandwich bioassays for potential biomedical applications

Lee H.J.

Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 41566, South Korea

Surface sandwich bioaffinity sensing platforms have become an indispensable bioanalytical tool for the rapid screening and detection of biological and chemical molecules in real fluidic samples. In this presentation, I will discuss our recent efforts made on the development of highly selective bioaffinity chip platforms in conjunction with DNA aptamer and various shapes and sizes of gold and carbon nanoparticles for biological applications. Three different detection metholodogies including surface plasmon resonance, voltammetry and colorimetry were utilized. The first part of my talk will include the development of different sets of antibody-aptamer or aptamer-aptamer bioreceptor pair sandwich assays specific for target analytes including disease diagnosis biomarkers such as protein tyrosine kinase 7 [1], alpha-1-antitrypsin [2], tau 381 [3], amyloid-beta(1-42) [4], as well as noro [5] and avian influenza [6] virus proteins in biological fluids in addition to some of commonly recognized diseases related metabolites. The second part of my talk will highlight our latest development on lateral flow based bioaffinity sensing platforms in conjunction with biofunctionalized nanoparticles and surface sandwich complex formation for protein biomarker molecules. Finally, future aspects and challenging issues of our aptamer based bioaffinity sensing platforms will be suggested.

1. *Lee S., Hayati S., Kim S., Lee H.J. Determination of protein tyrosine kinase-7 concentration using electrocatalytic reaction and an aptamer-antibody sandwich assay platform. // Catal. Today. – 2019. – in press, doi: 10.1016/j.cattod.2019.05.029*
2. *Zhu G., Lee H.J. Electrochemical sandwich-type biosensors for α-1 antitrypsin with carbon nanotubes and alkaline phosphatase labeled antibody-silver nanoparticles. // Biosens. Bioelectron. – 2017. – V. 89. – P. 959–963.*
3. *Kim S., Wark A.W., Lee H.J. Femtomolar Detection of Tau Proteins in Undiluted Plasma Using Surface Plasmon Resonance. // Anal. Chem. – 2016. – V. 88. – P. 7793–7799.*
4. *Diba F.S., Kim S., Lee H.J. Electrochemical immunoassay for amyloid-beta 1–42 peptide in biological fluids interfacing with a gold nanoparticle modified carbon surface. // Catal. Today. – 2017. – V. 295. – P. 41–47.*
5. *Kim S., Lee S., Lee H.J. An aptamer-aptamer sandwich assay with nanorod-enhanced surface plasmon resonance for attomolar concentration of norovirus capsid protein. // Sens. Actuators B. – 2018. – V. 273. – P. 1029–1036.*
6. *Diba F.S., Kim S., Lee H.J. Amperometric bioaffinity sensing platform for avian influenza virus proteins with aptamer modified gold nanoparticles on carbon chips. // Biosens. Bioelectron. – 2015. – V. 72. – P. 355–361.*

Molecular determinants of cell death triggering by semisynthetic polycyclic compounds: what can we learn by analysis of gene regulatory networks in silico?

Markov A.V.[1], Kel A.E.[1,2], Logashenko E.B.[1], Zenkova M.A.[1]

[1] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*
[2] *geneXplain GmbH, Wolfenbüttel, Germany*

Semisynthetic triterpenoids, bearing cyano enone functionality in ring A, are being considered now as novel promising anti-tumor agents. Such compounds were shown to display strong apoptogenic effect in different tumor cell lines, effectively suppress tumor growth in abundant murine models and a range of them, particularly CDDO-Me and its analogs, are being now in clinical trials. However, despite the large-scale studies, the effects of cyano enone-bearing triterpenoids on cervical carcinoma cells and, moreover, mechanisms underlying cell death activation by such compounds in this cell type have not been fully elucidated. In this work, we attempted to reconstitute the key pathways and master regulators involved in response of human cervical carcinoma KB-3-1 cells on novel glycyrrhetinic acid derivative soloxolone methyl (SM) by a transcriptomic approach. Gene expression profiling revealed that treatment of KB-3-1 cells by SM for 1-10 h caused significant change in expression of totally 1245 genes in comparison with untreated cells (fold change > 1.5, $p<0.05$). Functional analysis of identified differentially expressed genes (DEGs) showed high enrichment of three main types of pathways induced by SM in the cells, notably dysregulation of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis, switching on compensatory survival mechanisms to counteract with the SM-induced stress, identified on early stage of SM treatment (1-4 h), and triggering cell death pathways on the late phase of the triterpenoid action (6-10 h). Functional annotation of co-expressed DEGs and analysis of cis-regulatory sequences of these genes clearly indicated that ER stress could be considered as central event triggered by SM in KB-3-1 cells. A range of ER stress pathway regulators, AP-1, C/EBP and NF-kB were identified as upstream transcriptional regulators, controlling response of KB-3-1 cells to the triterpenoid. Connectivity Map analysis revealed similarity of SM's gene expression profiles with those of known ER stress inductors thapsigargin and geldanamycin, targeting SERCA and Grp94, respectively. According to the molecular docking study, SM could snugly fit into the active sites of these proteins in the positions very close to that of both inhibitors. Taken together, our findings provide a basis for the better understanding of the intracellular processes in tumor cells switched on in response to cyano enone-bearing triterpenoids.

This research was supported by the Russian Science Foundation (Grant № 17-75-20120) and Russian State funded budget project of ICBFM SB RAS № AAAA-A17-117020210024-8.

Antitumor activity of exogenous ribonucleases in vitro and in vivo: the search for molecular targets among miRNAs

Mohamed I.S.[1,2], Nadyrova A.[3], Sen'kova A.V.[1], Zenkova M.A.[1], Mironova N.L.[1]

[1] *Institute of chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia*
[2] *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*
[3] *Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal (Volga-Region) University, Kazan, Russia*

Exogenous ribonucleases (RNases) have potential cytotoxicity on cancer cells due to their ability to destroy RNA and, consequently, inhibit protein biosynthesis at the transcriptional and translational levels. Also, the use of RNases as anticancer therapy helps to balance pathological molecular changes occurring in tumor cells and thus control their malignant behavior. Here, we investigated the ability of exogenous ribonucleases to reduce the invasive potential of B16 melanoma and A549 in vitro. It was found that binase had a cytotoxic effect on MCF-7 breast cancer cell line ($IC_{30} \approx 200$ μg/ml). Also, the cytotoxic effect of binase on HeLa cells was revealed ($IC_{10} \approx 15$ μg/ml). At the same time, binase reduced the rate of cell migration by 1.5-2 times depending on the dose used compared to the control. Significantly lower doses of RNase A (2.5 - 5 μg/ml) inhibited the migratory activity of A549 cells.

The change in the miRNA profile of melanoma B16 cells was assessed under the action of binase and RNase A *in vitro.* It was shown that expression levels of tumor suppressor miRNAs were upregulated and oncomir miRNAs were downregulated after treatment with Binase and RNase A.

In experimental model of drug-resistant lymphosarcoma RLS40 of mice it was shown that binase and RNase A caused 3-fold retardation of primary tumor growth and essential decrease in metastases area in the liver. In the tumor tissue of mice bearing RLS_{40} after treatment with binase, it was shown that binase as well as RNase A caused the upregulation of both oncomirs and tumour-suppressor microRNAs, including microRNAs of the let-7 family, known to negatively regulate tumour progression. While in the blood serum of mice bearing RLS_{40}, binase caused the decrease of oncomir levels and increase in tumour-suppressor microRNAs (let-7g). These results coincide with results obtained for RNase A in model of Lewis ling carcinoma of mice.

Our results suggest that ribonucleases change balance between oncogenic and tumour-suppressor miRNAs brings to the reduction of tumour malignancy resulting in inhibition of tumour growth and metastasis. In conclusion, these two exogenous ribonucleases can be used both as promising antitumor therapeutics and tools for search for miRNA among oncomirs overexpressed upon tumor progression that can be targeted by antisense oligonucleotides or their derivatives.

This work was supported by Russian State funded budget project of ICBFM SB RAS # AAAA-A17-117020210024-8 and grant RFBR no. 17-00-00059.

Peptidyl-oligonucleotide conjugates: from single and dual conjugates to different types of bulge-inducing conjugates

Yaroslav Staroseletz[1], Bahareh Amirloo[2], Elena Bichenkova[2], Marina Zenkova[1]

[1] *Institute of Chemical Biology and fundamental medicine*
[2] *School of PharmacyManchester University*

Peptidyl-oligonucleotide conjugates (POC) are a group of artificial RNases targeting RNA of choice in sequence-specific manner. POCs utilize short amphiphilic peptide, consisting of alternating leucine and arginine residues as a catalytic group: (LR)4G and (LRG)2. DNA oligonucleotide serves as recognition motif of POC. The length of recognition motif has to ensure strict specificity of RNA cleavage and to provide binding of POC with RNA target.

Three series of POCs, based on three conceptual foundations were targeted against TΨC-loop of yeast $tRNA^{Phe.}$ The first series includes 5 single conjugates (SC), characterized by peptide attached to 5'-end of 17-mer oligodeoxynucleotide via zero-length linker and differed by peptide structure [1]. The conjugates of the second series (dual conjugates, DC) place the catalytic peptide in-between two oligodeoxynucleotide recognition motifs [2]. These conjugates vary in all elements of structure: peptide, oligonucleotide and linker. The conjugates of the third series (bulge inducing conjugates, BC) place the catalytic peptide at an internal position within an oligonucleotide sequence opposite to a bulge formed in RNA target upon hybridization with POC.

Each series of POCs was variegated, including totally inactive and catalytically active POCs with several medium variants. Cleavage activity of the conjugate depends on such factors as peptide structure, linker length and oligonucleotide sequence. Two subseries of BC appeared to be totally different as cleaving agents. BCs with peptide attached with amino-hexyl linker via C8-adenosine didn't cleave $tRNA^{Phe}$. In contrast attachment of peptide to C1' of deoxyribose (either α-, or β-anomer) provides cleavage activity to the conjugate.

Conjugates-leaders demonstrated 100% cleavage extent of $tRNA^{Phe}$ in time diapason from 4 to 48 h at 20 μM POCs and 1 μM $tRNA^{Phe}$ concentration. Several types of cleavage pattern were revealed. Conjugates cleave both at target site region ^{61}CACAG^{65} and outside this region with either G-X or Pyr-X specificity.

1. *Williams A., Staroseletz Y., Zenkova M.A., Jeannin L., Aojula H., Bichenkova E. Peptidyl-oligonucleotide conjugates demonstrate efficient cleavage of RNA in a sequence-specific manner. Bioconjugate Chem. – 2015. – V. 26. P 1129–1143.*
2. *Staroseletz Y., Williams A., Burusco K., Alibay I., Vlassov V., Zenkova M., Bichenkova E. 'Dual' peptidyl-oligonucleotide conjugates: Role of conformational flexibility in catalytic cleavage of RNA.. Biomaterials. – 2016. – V. 112. - P 44–61.*

This work received financial support from Russian Science Foundation grant № 19-14-00250 and Russian State funded budget project of ICBFM SB RAS № AAAA-A17-117020210024-8.

Связь между циркулирующими SINE и LINE элементами пула внДНК крови с ингибированием метастазирования под действием ДНКазы I

Алексеева Л.А., Сенькова А.В., Зенкова М.А., Миронова Н.Л.

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

Опухоль-ассоциированные внеклеточные ДНК (оа-внДНК) играют важную роль на всех стадиях развития опухоли. Они участвуют в трансформации нормальных клеток согласно гено-метастатической теории [1], способствуют миграции опухоли и ее инвазии благодаря интеграции в нейтрофильные ловушки в опухолевом окружении [2]. ДНКаза I – многообещающий препарат для лечения онкологических заболеваний в связи с ее способностью деградировать внДНК.

Проведенные ранее исследования с использованием экспериментальных моделей опухолей доказали высокий антиметастатический потенциал ДНКазы I [3]. Методом NGS среди циркулирующих внДНК были выявлены молекулярные мишени ДНКазы I: 224 типа тандемных повторов, включающих SINE и LINE элементы [4]. При использовании моделей карциномы легких Льюис, меланомы B16 и лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS_{40} мыши было показано, что прогрессирование опухоли сопровождается увеличением уровня элементов SINE и LINE в пуле циркулирующих внДНК. Применение ДНКазы I для лечения животных значительно снижало представленность SINE и LINE элементов в пуле циркулирующих внДНК, что коррелировало со снижением количества и площади метастазов, а также размера первичного опухолевого узла. Полученные результаты показали, что SINE и LINE элементы являются важными участниками метастазирования и могут быть использованы в качестве новых мишеней для контроля прогрессирования опухоли под действием терапевтических нуклеиновых кислот, а также маркеров ответа на проводимую терапию

1 *García-Olmo D., García-Olmo D.C., Ontañón J., Martinez E., Vallejo M. Tumour DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genometastasis // Histol. Histopathol. – 1999. – V. 14. – P. 1159–1164.*
2. *Hawes M.C., Wen F., Elquza E. Extracellular DNA: a bridge to cancer // Cancer Res. – 2015. – V. 75. – P. 4260–4264.*
3. *Patutina O.A., Mironova N.L., Ryabchikova E.I., Popova N.A., Nikolin V.P., Kaledin V.I., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Inhibition of metastasis development by daily administration of ultralow doses of RNase A and DNase I // Biochimie. – 2011. – V. 93. – P. 689–696.*
4. *Alekseeva L.A., Mironova N.L., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Patutina O.A., Zenkova M.A. The antimetastatic action of bovine pancreatic DNase I is mediated via alteration of the exDNA level in blood serum of LLC-bearing mice // PLoS One. – 2017. – V. 12. – e0171988.*

Работа выполнена при финансовой поддержке Проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210024-8 и РНФ 17-74-10144.

МикроРНК и их участие в патогенезе рассеянного склероза

Баулина Н.М.[1,2], Осьмак Г.Ж.[1,2], Киселев И.С.[1,2], Попова Е.В.[1], Бойко А.Н.[1], Кулакова О.Г.[1,2], Фаворова О.О.[1,2]

[1] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия*
[2] *Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, Москва, Россия*

В последние годы микроРНК – малые некодирующие РНК – зарекомендовали себя в качестве ключевых регуляторов различных биологических процессов, включая иммунный ответ и воспаление, что позволило предположить их участие в механизмах, лежащих в основе патогенеза рассеянного склероза (РС) - аутоиммунного заболевания центральной нервной системы, основной формой которого является ремиттирующий РС (РРС). Течение РРС определяется чередованием периодов обострения и ремиссии. С целью поиска микроРНК, ассоциированных с формированием РРС и активностью его течения, был проведен анализ их экспрессии с использованием двух подходов – полнотранскриптомного профилирования, не основанного на каких-либо гипотезах, и подхода «ген-кандидат» – у мужчин и у женщин в мононуклеарных клетках крови (МНК).

При полнотранскриптомном профилировании выявлены принципиальные различия в профилях микроРНК, дифференциально экспрессирующихся при РРС в МНК у мужчин и у женщин в сравнении с индивидами контрольной группы того же пола ($-1<Log_2FC>1$; $p<0.05$). Основное наблюдаемое различие заключается в повышении экспрессии многих генов микроРНК из двух больших кластеров 14q32.2 и 14q32.31 импринтированного локуса DLK1-DIO3, наблюдаемой при РРС только мужчин. Повышенная экспрессия miR-431, miR-127-3p, miR-379, miR-376c, miR-381, miR-410 и miR-656 из локуса DLK1-DIO3 в МНК больных РРС мужчин по сравнению со здоровыми мужчинами была верифицирована на независимых расширенных выборках с помощью RT-qPCR ($Log_2FC>2.5$; $p_{corr}<0.05$). У больных РРС женщин уровни экспрессии этих микроРНК были на том же уровне или несколько ниже, чем у больных РРС мужчин, но не отличались от здоровых женщин. Эти результаты свидетельствуют о гендерной специфичности экспрессии микроРНК из этого локуса. Использование кандидатного подхода показало повышение экспрессии miR-126-3p, miR-146b-5p, miR-155, miR-21-5p и miR-223-3p в стадии ремиссии в сравнении с обострением. Эффект носит более выраженный характер у мужчин. Эти данные впервые показывают роль микроРНК-опосредованной регуляции при подавлении активного воспаления при РРС.

Данные биоинформатического анализа указывают на преимущественное вовлечение микроРНК, дифференциально экспрессирующихся при формировании РРС или изменениях в активности его течения, в регуляцию сигнальных путей, активируемых через рецепторные тирозинкиназы. Полученные результаты могут рассматриваться как отправная точка для дальнейшего изучения выявленных микроРНК с точки зрения перспектив использования в клинической практике для лечения РРС.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 17-00-00206

Природные и модифицированные С-богатые ОДН в дизайне pH-сенсоров

Варижук А.М.[1], Цветков В.Б.[1], Тураев А.В.[1], Исаакова Е.А.[1], Северов В.В.[1], Аралов А.В.[2], Позмогова Г.Е.[1]

[1] *Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия*
[2] *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Синтетические олигодезоксирибонуклеотиды (ОДН) или фрагменты геномной ДНК, содержащие олиго-dC блоки (dCn, n≥5), способны формировать метастабильные при физиологических условиях интеркалированные параллельные дуплексы – i-мотивы (IM) [1]. Ядро таких структур составляют гемипротонированные цитозиновые пары. В случае четырех Cn блоков в одном ОДН IM-структуры, как правило, являются внутримолекулярными. Необходимость протонирования половины цитозиновых остатков определяет pH-чувствительность IM.

Мы показали, что внутримолекулярные IM из генома человека склонны к быстрым перестройкам (фолдинг/расплетение) при изменении pH в пределах естественного для внутриклеточной и внеклеточной сред диапазона значений [2]. Синтетические аналоги геномных IM имеют перспективы применения в терапии и диагностике – в частности, в конструировании pH-сенсоров с быстрым откликом. Кинетические характеристики сенсора (скорость отклика) значимы, прежде всего, при мониторинге быстрых процессов, таких как активация нейронов. Предлагавшиеся ранее сенсоры на основе межмолекулярных IM характеризуются неоптимальным рабочим диапазоном и/или медленной кинетикой. Известные альтернативы (например, генетические кодируемые pH-индикаторы) также имеют свои ограничения.

Мы приводим несколько вариантов дизайна сенсоров на основе IM-ОДН с терминальными метками (FRET-пары или пары флуорофор-гаситель). Прототипы сенсоров охарактеризованы *in vitro* оптическими методами; оценены кинетические параметры их фолдинга. Предложены подходы к оптимизации IM (стабилизации и смещению диапазона pH-чувствительности) за счет химической модификации (введения в ОДН неприродных фрагментов – феноксазиновых производных и др.) [3]. Полученные нами прототипы сенсоров на основе IM-ОДН могут быть использованы для прояснения и отслеживания ассоциированных с изменением pH внутриклеточных процессов в норме и при патологии.

[1] Wright E., Huppert J., Waller Z. Identification of multiple genomic DNA sequences which form i-motif structures at neutral pH. Nucleic Acids Res. – 2017: - V. 45. - P. 2951-2959.
[2] Tsvetkov V., Zatsepin T., Turaev A., Farzan V., Pozmogova G., др. всего 7 человек. DNA i-Motifs with guanidino-i-clamp residues: the counterplay between kinetics and thermodynamics and implications for the design of pH sensors. – Comput. Struct. Biotechnol. J. – 2019: - V. 17. – P. 527-536.
[3] V.B Tsvetkov, Zatsepin T., Belyaev E., Kostyukevich Y., др. всего 9 человек. i-Clamp phenoxazine for the fine tuning of DNA i-motif stability. Nucleic Acids Res. – 2018: - V. 46. – P. 2751-2764.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ и Правительства Москвы, грант № 19-34-70004.

Лекарственное средство для лечения глиобластомы человека на основе рекомбинантного штамма вируса осповакцины

Васильева Н.С.[1], Войтова А.А.[1], Кочнева Г.В.[1,2], Коваль О.А.[1,3], Рихтер В.А.[1], Кулигина Е.В.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия*
[3] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Мультиформная глиобластома является наиболее распространенной и злокачественной опухолью центральной нервной системы. Средняя выживаемость пациентов с глиобластомой составляет примерно 14 месяцев. Несмотря на стандартное лечение, которое включает максимальную хирургическую резекцию опухоли с последующей радио- и/или химиотерапией, прогноз при таком диагнозе остаётся неблагоприятным. Паллиативность стандартного лечения обусловлена определенными особенностями опухоли, среди которых, в частности, можно выделить высокий пролиферативный и инвазивный потенциал опухолевых клеток и их устойчивостью к радио- и химиотерапии.

Таким образом, поиск более эффективных подходов для лечения глиобластомы является одним из самых актуальных направлений современных биомедицинских исследований.

Одним из таких подходов является виротерапия или терапия с помощью онколитических вирусов. На сегодняшний день изучены противоопухолевые свойства различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов, а некоторые из них уже разрешены к применению для лечения злокачественных новообразований различной локализации. Коллективом специалистов из ИХБФМ СО РАН и ГНЦ ВБ «Вектор» разработан рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины. Данный штамм несёт делеции фрагментов генов вирусных тимидинкиназы и ростового фактора, в районы которых встроены ген ГМ-КСФ и ген онкотоксического белка лактаптина, соответственно. VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью в отношении ряда линий опухолевых клеток человека, в том числе глиом. Показана противоопухолевая эффективностью этого штамма в отношении злокачественных опухолей молочной железы человека в модели ксенографтов.

Целью данной работы является изучение цитотоксической активности и противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении глиобластомы человека.

В экспериментах in vitro показано, что VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью в отношении клеток линий U87 MG, U251 MG, U343 MG и T98G глиобластомы человека. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении глиобластомы показана на опухолях U87 MG и U343MG, подкожно трансплантированных мышам линии SCID. Индекс торможения роста опухоли составил 89,5% и 83%, соответственно. Показана способность VV-GMCSF-Lact проникать через ГЭБ при внутривенном введении и реплицироваться в ортотопически трансплантированной опухоли U87 MG.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, ГК № 14.N08. 11.0189.

Биораспределение терапевтических нуклеиновых кислот в организме здоровых мышей и мышей-опухоленосителей

Гладких Д.В.[1], Черников И.В.[1], Шмендель Е.В.[2], Мещанинова М.И.[1], Веньяминова А.Г.[1], Маслов М.А.[2], Зенкова М.А.[1], Черноловская Е.Л.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *МИРЭА-Российский технологический университет, Москва, Россия*

Прямым подходом к получению средств воздействия на функционирование генов и их структуру, является разработка конструкций на основе олигонуклеотидов и полинуклеотидов: терапевтических нуклеиновых кислот (ТНК). Основной проблемой, которая сдерживает развитие и применение конструкций на основе ТНК в терапии является проблема их доставки в клетки и ткани организма.

Для такой доставки широко используют композиции, содержащие катионные липиды, которые эффективно взаимодействуют с отрицательно заряженной НК образуя липоплекс, преимущественно накапливающиеся в высоко васкуляризированных органах: печени, почках, сердце, легких, однако не обладающие какой-либо выраженной специфичностью. Мы показали, что комплексы ТНК с липосомами на основе низкотоксичного поликатиона 2Х3 и липид-хелпера DOPE, показавшие свою эффективность в культуре клеток, с низкой эффективностью накапливаются во внутренних органах и ксенографтной опухоли и достаточно быстро выводятся из организма мыши.

Поэтому при разработке средств доставки ТНК преимущество имеют липоплексы, несущие лиганды к определенным клеточным рецепторам, что обеспечивает накопление эффективной терапевтической дозы ТНК в органе-мишени. Нами показано, что липосомы на основе 2Х3-DOPE с новым липоконъюгом FC, содержащим в качестве нацеливающего компонента фолиевую кислоту, эффективно, до 15-18% от общего накопления в органах, доставляют ТНК в клетки опухоли, экспрессирующие фолатные рецепторы, не токсичны для мышей и не вызывают активации неспецифического иммунитета.

Другим эффективным способом улучшения биодоступности и обеспечения доставки НК в клетки и ткани является образование биоконъюгатов с липофильными молекулами, антителами, аптамерами и амфифилами. Присоединение холестерина к siРНК обеспечивает ее эффективное накопление в печени, почках, опухолях, а так же сердце и легких, уменьшает задержку в почках после внутривенного и внутрибрюшинного введения. Основная часть холестерин-siРНК после внутримышечных и подкожных инъекций остается в месте инъекции. Данные конфокальной микроскопии показали, что через 24 часа после внутривенной инъекции холестерин-siРНК распределяется в ткани и присутствует в цитоплазме почти всех клеток как печени, так и опухоли, в которой накапливается около 6% siРНК.

Таким образом, «адресованные» липосомы и биоконъюгаты с холестерином обеспечивающие эффективную доставку ТНК в клетки опухоли, печени и почек являются перспективными компонентами потенциальных лекарственных препаратов.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 18-29-08009 мк и РНФ 19-14-00251.

Механизмы антифунгицидного действия амфифильных антимикробных пептидов

Григорьева А.Е., Бардашева А.В., Тупицына А.В., Амирханов Н.В., Рябчикова Е.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины,
Новосибирск, Россия

Поиск новых антигрибковых агентов является актуальной задачей, так как многие штаммы микроорганизмов устойчивы к применяемым в клинике антибиотикам. В последнее десятилетие внимание исследователей привлекают антимикробные пептиды (АМП), обладающие высокой антимикробной активностью. Однако, природные АМП имеют ряд недостатков, в связи с чем ведется разработка препаратов на основе синтетических АМП. Цель данной работы: исследование механизмов воздействия коммерчески доступного пептида P1, обладающего высокой амфифильностью, на клетки гриба *Candida albicans* 34 (Коллекция экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН).

Минимальная подавляющая концентрация (МПК) и минимальная фунгицидная концентрация (МФК) пептида P1 составили 5 и 10 мкМ. Ингибирование роста гиф наблюдалось при концентрации пептида P1 2,5 мкМ. МПК и МФК для флуконазола составили >3,2 мМ, для клотримазола – > 1,24 мМ.

Электронно-микроскопическое исследование выявило значительные изменения морфологии клеток *C. albicans* уже через 15 мин инкубации с пептидом P1, в первую очередь затрагивающие клеточную стенку – основную природную защиту клеток от повреждающих воздействий. Инкубация с пептидом P1 привела к утолщению и реорганизации клеточной стенки, а также к появлению крупных жировых капель в цитоплазме, свидетельствующих об изменениях метаболизма клеток. При дальнейшей инкубации с пептидом P1 деструктивные изменения клеток *C. albicans* нарастали.

Синтетические АМП – сравнительно новый класс препаратов, механизмы действия которых в отношении дрожжеподобных грибов и *C. albicans*, в частности, изучены недостаточно. Опубликованные механизмы действия пептидов базируются на предположении о повреждении плазмолеммы и основаны на свойствах пептидов, а не на прямой визуализации данного процесса [1]. Однако, первой линией защиты клеток грибов является клеточная стенка, именно она первой сталкивается с повреждающим действием препаратов [2]. Результаты нашего исследования показывают, что клеточная стенка *C. albicans* быстро реагирует на воздействие пептида P1, изменения наблюдаются в динамике 8-часовой инкубации, в то время как плазмолемма визуально сохраняет свою целостность.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработки противогрибковых препаратов на основе амфифильного пептида P1 и о необходимости дальнейших исследований механизмов его действия.

1. *Li J., J. J. Koh, S. Liu, R. Lakshminarayanan, C.S. Verma and R.W. Beuerman. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design // Front Neurosci. – 2017. – V. 11. – P. 73*
2. *Osumi, M. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation // Micron. 1998. – V. 29. – P. 207-233*

Исследование поддержано грантом РФФИ № 18-34-00111.

Особенности нековалентного взаимодействия двуцепочечных нуклеиновых кислот с поверхностью наночастиц золота

Епанчинцева А.В., Рябчикова Е.И., Пышная И.А.

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

Наночастицы на основе металлов, в т.ч. золота (НЧЗ), в настоящее время являются распространенной платформой для получения средств тераностики с использованием нуклеиновых кислот (НК). НЧЗ обладают такими свойствами, как высокая коллоидная стабильность, оптическое поглощение в видимой области с высоким молярным коэффициентом экстинкции, возможность контролируемого синтеза с заданными параметрами (форма, размер, стабилизирующий агент), возможность использования в колориметрических сенсорах.

Широко распространен метод ковалентной адсорбции тиол-содержащих нуклеиновых кислот на поверхность НЧЗ, обеспечивающий высокую плотность покрытия наночастиц нуклеиновыми кислотами [1]. Для адсорбции дуплекса ковалентно присоединяется к поверхности НЧЗ только одна цепь, которая не способна десорбироваться с поверхности НЧЗ в мягких условиях. В то же время в некоторых случаях принципиально важна десорбция обеих цепей дуплекса НК. Напротив, нековалентная адсорбция НК обеспечивает полную десорбцию дуплекса [2].

Целью исследования было получение нековалентных наноконструкций на основе НЧЗ и двуцепочечных НК (дцНК) с высокой поверхностной плотностью олигонуклеотидного слоя.

Оптимизировали такие параметры связывания, как продолжительность инкубации НЧЗ и НК, объем реакционной смеси и содержание NaCl. Провели сравнение параметров адсорбции одноцепочечных и двуцепочечных НК на поверхности НЧЗ. Результаты получены методами гель-электрофореза, измерения интенсивности флуоресценции, динамического светорассеяния и просвечивающей электронной микроскопии. Установили, что в оптимальных условиях связывания поверхностная плотность дцНК в составе нековалентных конструкций превышает 100 дуплексов на одну НЧЗ [2]. Это значение, по меньшей мере, не уступает плотности покрытия в составе ковалентных аналогов [3] и подтверждает перспективность использования НЧЗ как эффективных носителей НК.

1. *Barnaby S., Perelman G., Kohlstedt K., Chinen A., Schatz G., et al. Design Considerations for RNA Spherical Nucleic Acids (SNAs). // Bioconjug. Chem. – 2016. – V. 27. – P 2124-2131.*
2. *Poletaeva J., Dovydenko I., Epanchintseva A., Korchagina K., Pyshnyi D., et al. Non-Covalent Associates of siRNAs and AuNPs Enveloped with Lipid Layer and Doped with Amphiphilic Peptide for Efficient siRNA Delivery. // Int J Mol Sci. – 2018. – V. 19. P 2096.*
3. *Barnaby S., Lee A., Mirkin C. Probing the inherent stability of siRNA immobilized on nanoparticle constructs. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2014. – V. 111/ - P 9739–9744.*

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 19-15-00217.

Молекулярные механизмы антипролефиративного и интерферон-индуцирующего действия короткой двуцепочечной РНК

Жоров М.И., Кабилова Т.О., Власов В.В., Зенкова М.А., Черноловская Е.Л.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СОРАН, Новосибирск, Россия

Короткие двуцепочечные РНК способны активировать систему врожденного иммунитета в зависимости от их структуры, последовательности и способа проникновения в организм. Иммуностимулирующая активность РНК может быть использована при лечении вирусных и опухолевых заболеваний. Была обнаружена короткая двуцепочечная РНК (далее – isРНК), обладающая IFN-α-индуцирующей активностью в отношении мононуклеаров переферической крови in vitro, а также противоопухолевой и антиметастатической активностями на мышиных моделях in vivo. Изучаемая isРНК не имела существенной гомологии с мРНК человека или мыши. Целью данного исследования являлось выявление молекулярных механизмов, и определение эффекторных клеток, опосредующих интерферон-индуцирующую активность isРНК.

Для изучения молекулярных механизмов действия isРНК, была исследована активация экспрессии 84 генов, ассоциированных с системой врожденного и приобретенного иммунитета, с помощью ПЦР в реальном времени с использованием RT^2 Profiler PCR Array.

Результаты показали, что интерферон и цитокин-индуцирующее действие isРНК может быть опосредовано сигнальными путями, запускаемыми рецепторами TLR3/7/8, MDA5, RIG-I и NOD2.

Для определения клеток-эффекторов isRNA, индивидуальные типы иммунных клеток (Натуральные клетки, Т, В клетки, дендритные клетки, моноциты и макрофаги) были выделены методом иммуномагнитной сорбции. Исследование интерферон-индуцирующей активности isРНК в разных типах иммунных клеток показало, что эффекторными клетками, опосредующими иммуностимулирующую активность isРНК, являются антиген-представляющие клетки врожденного и приобретенного иммунитета, а именно: дендритные клетки и моноциты.

Исследование было поддержано Российским научным фондом (грант No 16-15-10105).

Природные модифицированные нуклеотиды в составе направляющих РНК для модулирования свойств искусственных регуляторов экспрессии генов

Журавлев Е.С.[1], Вохтанцев И.П.[1,2], Устьянцева Е.И.[1,2,3], Кулишова Л.М.[1], Семенов Д.В.[1], Жарков Д.О.[1,2], Степанов Г.А.[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*
[3] *Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия*

Стратегия включения модифицированных нуклеотидов в структуру искусственных регуляторов экспрессии генов на основе РНК широко распространена при конструировании аналогов различных классов РНК. Введение модификаций позволяет избирательно корректировать свойства получаемых молекул РНК.

Первоначально данный подход был применен нами для выявления особенностей функционирования в клетках человека ряда малых ядрышковых C/D-бокс-РНК. С целью устранения неспецифических цитотоксических эффектов, вызываемых немодифицированными аналогами мяоРНК, были получены РНК, содержащие в своей структуре модифицированные нуклеотиды: m^6A, m^5C и Ψ. Было установлено, что введение Ψ и m^5C в структуру искусственных коротких нкРНК существенно снижает их иммуностимулирующее действие. Для подтверждения наблюдаемого эффекта проводили оценку изменений в экспрессии генов методами полнотранскриптомного анализа и ОТ-ПЦР, а также сравнение пролиферации клеток в реальном времени в условиях трансфекции полученными РНК. Кроме того, было показано, что модифицированные РНК в меньшей степени активируют клеточные рецепторы PKR и RIG-I по сравнению с немодифицированными аналогами. Обнаруженный эффект связан с повышением термодинамической стабильности элементов вторичной структуры РНК при включении модифицированных нуклеотидов [1].

Полученные результаты и разработанные стратегии синтеза были использованы для получения sgРНК, обеспечивающих целевое действие нуклеазы Cas9 в модельных системах редактирования заданных генов. С использованием web-инструмента TIDE было показано, что введение модификаций (m^6A, m^5C и Ψ) в структуру sgРНК не снижает эффективность работы комплексов Cas9/sgРНК при трансфекции их в клетки человека. Кроме того, модифицированные мономеры снижали иммуностимулирующее и цитотоксическое действие sgРНК. Результаты, полученные в экспериментах in vitro с использованием рекомбинантного белка SpCas9 и модифицированных sgРНК, позволили заключить, что введение модификаций в структуру sgРНК изменяет соотношение активностей доменов RuvC и HNH.

Таким образом, применение модифицированных нуклеотидов, с одной стороны, позволяет корректировать свойства регуляторов экспрессии генов и, с другой стороны, дает новую информацию о взаимодействии природных и искусственных РНК с белками-партнерами.

1. Stepanov G.A., Zhuravlev E.S. et al. // Genes. 2018. V. 9. 531.

Исследование выполнено при частичной поддержке проекта базового бюджетного финансирования Минобрнауки РФ (0245-2019-0001) и гранта Президента РФ для молодых российских ученых (МК-6196.2018.4).

Валидация Ubr убиквитин лигаз в качестве мишени для терапии гепатоклеточной карциномы

Лебоф Д.[1], Абакумова Т.А.[1], Пятков К.И.[1], Зацепин Т.С.[1,2]

[1] *Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия*
[2] *Химический факультет московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия*

Гепатоклеточная карцинома (ГЦК) занимает пятое место в мире по распространенности и третье по смертности среди онкологических заболеваний в мире. ГЦК устойчива к противоопухолевым препаратам, применяющихся в клинической практике, что делает пересадку печени единственно возможным методом терапии. В этом году провалились клинические испытания антитела, блокирующего рецептор PD-1, для терапии ГЦК, которое показало отличные результаты для иммунотерапии ряда других онкологических заболеваний.

Правило N-концевой последовательности важно для биологии рака, так как оно участвует в регуляции ангиогенеза, пролиферации и гибели клеток, что позволяет рассматривать этот путь в качестве мишени для терапии онкологических заболеваний. Целью данного исследования являлось изучение роли правила N-концевой последовательности в контексте ГЦК in vivo за счет подавления четырех убиквитин-лигаз UBR1, UBR2, UBR4 и UBR5 методом РНК-интерференции. Подавление экспрессии убиквитин-лигаз UBR2, UBR4 и UBR5 в перевиваемой культуре гепатоцитов мыши проводили смесью миРНК, упакованных в липидные наночастицы (ЛНЧ). Это приводило к подавлению пролиферации и миграции клеток, а также увеличивало их чувствительность к апоптозу и увеличивало внутриклеточную концентрацию АФК. Внутривенное введение миРНК в ЛНЧ мышам (2р/неделю, 6 недель) показали отсутствие токсичности, однако при этом наблюдалась инфильтрация нейтрофилов в печени и увеличение размера селезенки. В условиях аналогичного эксперимента с мышами, имеющими индуцированную ГЦК, происходило увеличение размеров опухоли при подавлении убиквитин-лигаз по сравнению с контрольной группой в связи с воспалением. Однако использование комбинации миРНК в ЛНЧ и препарата, индуцирующего апоптоз позволило эффективно подавить развитие ГЦК.

Исследование было поддержано программой NGP и грантом РНФ № 19-44-0411.

Накопление и биологическая активность холестериновых производных тримерных малых интерферирующих РНК *in vitro* и *in vivo*

Карелина У.А., Черников И.В., Гладких Д.В., Мещанинова М.И., Веньяминова А.Г., Власов В.В., Зенкова М.А., Черноловская Е.Л.

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

Малые интерферирующие РНК (siРНК) способны ингибировать экспрессию генов, в том числе связанных с различными заболеваниями. Поэтому исследования, направленные на разработку терапевтических препаратов на основе siРНК, являются актуальными.

Конъюгация siРНК с молекулами природного происхождения является наиболее перспективным способом доставки siРНК в клетки-мишени.

В данной работе изучена биологическая активность холестериновых производных нуклеазоустойчивой siРНК, направленной на мРНК гена *MDR1*. Ген *MDR1* является важной терапевтической мишенью для siРНК в борьбе с опухолевыми заболеваниями, поскольку его гиперэкспрессия вызывает синдром множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Сравнение свойств холестериновых конъюгатов канонической siРНК (21 п. н.) и тримерной tsiРНК (63 п. н.) показало, что при доставке конъюгатов с помощью трансфекционного агента в культивируемые клетки КВ-8-5 конъюгат tsiРНК проявляет значительно большую биологическую активность, чем конъюгат канонической siРНК. На модели ксенографта КВ-8-5 у мышей линии SCID показано, что холестериновый конъюгат tsiРНК более эффективно накапливается в опухоли после внутривенного введения, по сравнению с холестериновым конъюгатом канонической siРНК. Однако, определение биологической активности препаратов показало, что siРНК подавляет экспрессию гена-мишени на 60 % (по белку), в то время как tsiРНК малоактивна.

Конструирование конкатемерных тримерных siРНК (ctsiРНК) является новым подходом в разработке терапевтически эффективных нуклеиновых кислот. Для увеличения биологической активности тримерных tsiРНК было предложено внести одноцепочечные разрывы как в смысловую, так и в антисмысловую цепь тримерной tsiРНК. Предполагается, что внесение таких ников может обеспечить более эффективное образование RISC*. Показано, что при доставке в клетки без носителя холестериновые производные ctsiРНК способны подавлять экспрессию гена-мишени с такой же эффективностью, что и холестериновые конъюгаты канонической siРНК, несмотря на их менее эффективное накопление.

Можно ожидать, что данный подход позволит уменьшить эффективную дозу, необходимую для лечения опухолевых заболеваний. Поскольку увеличение молекулярной массы в случае тримерных tsiРНК приводит к значительному увеличению их накопления в опухоли, предполагается, что холестериновый конъюгат конкатемерной ctsiРНК будет эффективно накапливаться в клетках ксенографтной опухоли мыши и подавлять экспрессию гена *MDR1*.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 19-14-00251.

Исследования γ-ПНК, содержащих мономеры на основе L-Glu

Кириллова Ю.Г.[1,2], Танкевич М.В.[1,2], Прохоров И.А.[1], Варижук А.М.[2], Позмогова Г.Е.[2]

[1] *Институт тонких химических технологий, Российский технологический университет – МИРЭА*
[2] *Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России*

Пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК) [1] являются стабильными функциональными аналогами нуклеиновых кислот, которые обладают способностью гибридизоваться с комплеметарными последовательностями РНК и ДНК. Среди различных модификаций классических аминоэтилглициновых (*aeg*) ПНК γ-производные [2,3] являются особенно перспективными благодаря их преорганизованной вторичной структуре. Введение функциональных групп в боковые остатки ПНК позволяет моделировать свойства ПНК. Мы предположили, что отрицательно заряженные γ-ПНК могут быть по свойствам ближе к нативным олигонуклеотидам. Было получено три типа мономеров – *aeg*-, γ-S-метил- из L-Ala и γ-S-(3-бензилкарбокси)этил- из L-Glu. Оптимизация известных Boc-протоколов [4] позволила получить полианионный γ-олигомер H-Gly-CAGACTTA-Gly-NH_2, а также серию додекамеров ПНК, состоящих из чередующихся *aeg*- и γ-замещенных мономеров с общей последовательностью TCACCTTCCCTCC. Далее была исследована зависимость физико-химических свойств ПНК от наличия отрицательно заряженных остатков и числа хиральных центров в последовательности. Показано, что октамер на основе L-Glu образовывал стабильные параллельные и антипараллельные дуплексы с комплементарными олигодезоксирибонуклеотидами ($T_{пл.паралл.}$ = 35±1°C; $T_{пл.антипаралл.}$ = 46±1°C) и рибоолигонуклеотидами ($T_{пл.паралл.}$ = 53±1°C; $T_{антипаралл.}$ = 57±1°C) с высокой чувствительностью к единичным мисматчам в буфере, имитирующем внутриклеточную среду. Синтетические додекамеры, как и известные *aeg*-ПНК, оказались способными к формированию стабильных $ПНК_2$:ДНК триплексов.

Таким образом, результаты исследования различных типов ПНК показали, что ключевую роль при молекулярном узнавании полинуклеотидов играет стереохимия мономерных единиц ПНК, а тогда как отрицательный заряд может вносить лишь небольшой вклад в образование и стабильность комплексов олигомерных ПНК с ДНК(РНК).

1. *P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg and O. Buchardt, Science, 1991, 254, 1497.*
2. *A.Dragulescu-Andrasi, S. Rapireddy, B.M. Frezza, C. Gayathri, R.R. Gil, D.H. Ly J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 10258.*
3. *N. Tilani S. De Costa, J. M. Heemstra, PLoS One, 2013, 8, 128, 10258.*
4. *Kirillova Y, Boyarskaya N, Dezhenkov A, Tankevich M, Prokhorov I, Varizhuk A, et al. PLoS One, 2015, 10, e0140468.*

Молекулярные и клеточные механизмы патогенеза хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ)

Логашенко Е. Б.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – тяжелое, неуклонно прогрессирующее заболевание, являющееся одним из наиболее значимых и сложных проблем современной медицины, решение которой требует новых фундаментальных знаний. ХОБЛ уменьшает продолжительность и качество жизни больных, негативно влияет на общественное здоровье и снижает трудовые ресурсы. По данным ВОЗ, несмотря на активное внедрение в практику новых методов профилактики и лечения, распространенность и смертность от ХОБЛ не только не снижаются, но имеют тенденцию к увеличению. В настоящее время ХОБЛ является третьей причиной смерти от хронических неинфекционных заболеваний [ВОЗ, 2016]. ХОБЛ - заболевание с многофакторной этиологией, поскольку понятие «ХОБЛ» объединяет такие заболевания как хронический бронхит, заболевание периферических дыхательных путей и эмфизему легких. Наличие и вклад каждого из этих заболеваний обуславливает гетерогенность ХОБЛ в популяции, кроме того, результаты многочисленных исследований указывают на зависимость ХОБЛ от различных факторов риска.

Патофизиология ХОБЛ до настоящего времени полностью не изучена. Патогенез ХОБЛ включает в себя множество факторов риска, включая экологические, генетические и эпигенетические компоненты и комбинацию этих компонентов. Исследования показали, что основой патогенеза ХОБЛ является аномальное персистирующее воспаление бронхолегочной системы в ответ на воздействие повреждающих факторов. В патогенезе ХОБЛ важнейшую роль играет угнетение функциональной активности макрофагов, выступающих в качестве первой линии иммунной защиты организма. Однако молекулярно-клеточные механизмы этого процесса недостаточно изучены. Ключевую роль в патогенезе ХОБЛ играет также окислительный стресс, инициируя и опосредуя различные редокс-чувствительные пути передачи сигнала и экспрессию генов. Баланс системы провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, факторов роста, регулирующих их выработку и взаимодействие, а также привлекающих к месту воспаления новые иммунокомпетентные клетки, определяет степень перехода обратимой обструкции дыхательных путей в необратимую и, следовательно, определяет тяжесть течения ХОБЛ.

Существуют многочисленные данные, что в патогенезе заболевания важную роль играют различные микроРНК, которые могут выступать в качестве медиаторов воспаления, отвечающего за развитие и прогрессирование ХОБЛ, и могут рассматриваться в качестве новых терапевтических мишеней.

Исследование поддержано грантом Российского Научного Фонда № 19-74-30011 и РФФИ № 19-04-00836.

Удобные подходы к синтезу биоконъюгированных олигонуклеотидов

Мещанинова М.И.[1], Новопашина, Д.С.[1,2], Калашникова С.Г.[2], Энтелис Н.С.[3], Черноловская Е.Л .[1], Веньяминова А.Г.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*
[3] *Департамент молекулярной и клеточной генетики Страсбургского университета, Страсбург, Франция*

В настоящее время синтетические олигонуклеотиды, их аналоги и конъюгаты широко используются в различных областях, таких как молекулярно-биологические исследования, диагностика, а также в качестве перспективных терапевтических средств для лечения ряда заболеваний. Нерешенной до конца проблемой при их использовании является низкая эффективность их доставки в клетку. Решение этой проблемы, а также разработка подходов к регулированию внутриклеточного трафика синтетических олигонуклеотидов и конструкций на их основе, безусловно, расширит возможности их терапевтического применения.

Одним из подходов к адресной доставке НК в клетки-мишени является создание мультифункциональных конструкций на основе комплексов НК и их конъюгатов. Компонентами таких конструкций могут служить конъюгаты НК с различными адресующими молекулами, обеспечивающими направленную доставку, например, специфичными к определенным рецепторам или повышающими трансмембранное проникновение, или выполняющими обе эти функции одновременно. В этой роли могут выступать пептиды и белки, липофильные соединения, малые органические молекулы, наночастицы, аптамеры и др.

Нами разработаны твердофазные подходы к синтезу конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих гидрофобные группировки, витамины, пептиды, флуорофоры. Предложенные подходы позволяют получать конъюгаты, в которых олигонуклеотид и функциональная группировка соединены как стабильными, так и биодеградируемыми связями. Принципиальные возможности подходов были продемонстрированы на примере твердофазного синтеза конъюгатов модельных олигодезоксирибонуклеотидов, сенс-цепей siРНК, митохондриальных РНК, а также компонентов CRISPR/Cas системы митохондрий. Созданные конъюгаты терапевтических НК являются перспективными компонентами транспортных конструкций.

Данные подходы могут быть использованы для синтеза конъюгатов терапевтических нуклеиновых кислот с группировками различного типа действия.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 19-74-30011.

Двуликий Янус – внеклеточные нуклеиновые кислоты в опухолевой прогрессии

Миронова Н.Л.

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

Развитие опухоли сопровождается быстрой пролиферацией, потерей дифференциации, перепрограммированием энергетического метаболизма, потерей адгезии между клетками и опухолевым матриксом, уклонением от иммунного надзора, индукцией ангиогенеза и метастазированием. На всех этих этапах принимают участие опухоль-ассоциированные нуклеиновые кислоты (НК), которые играют роль двуликого Януса. С одной стороны, опухоль-ассоциированные НК играют отрицательную роль и способствуют прогрессии опухоли, с другой стороны являются важным звеном, формирующим противоопухолевый иммунитет. Отрицательную роль выполняют: регуляторные внРНК, участвующие в аутокринной и паракринной регуляции экспрессии их прото-онкогенных и онкосупрессорных мРНК [1]; внДНК, способствующие трансформации нормальных клеток [2], в том числе ретротранспозонные ДНК [3]; продуцируемые опухолью ДНК, укрепляющие так называемые нейтрофильные ловушки (NET), которые способствуют миграции и инвазии опухоли [4].

Кроме того, опухоль-ассоциированные НК могут играть и положительную роль в формировании противоопухолевого иммунитета. На этом их свойстве основано использование внНК как компонентов бесклеточных вакцин, адресованных к антиген-презентирующим клеткам иммунной системы [5].

Можно с уверенностью утверждать, что внНК являются важным участником межклеточной коммуникации и переключения внутриклеточных каскадов, контролирующих клеточную пролиферацию и дифференцировку, что делает их в случае положительной роли союзниками борьбы с опухолевой прогрессией, а в случае отрицательной роли – мишенями для терапевтических нуклеиновых кислот.

1. *Dalmay T., Edwards D. MicroRNAs and the hallmarks of cancer // Oncogene. – 2006. – V. 25. – P. 6170–6175.*
2. *Cai J., Wu G., Jose P.A., Zeng C. Functional transferred DNA within extracellular vesicles. Exp. Cell Res. – 2016. – V. 349. – № 1. – P. 179–183.*
3. *Carreira P., Richardson S., Faulkner G. L1 retrotransposons, cancer stem cells and oncogenesis // FEBS J. – 2014. – V. 281. – P. 63–73.*
4. *Hawes M., Wen F., Elquza E. Extracellular DNA: a bridge to cancer // Cancer Res. – 2015. – V. 75. – P. 4260–4264.*
5. *Markov O., Mironova N., Shmendel E., Serikov R., Morozova N., Maslov M., Vlassov V., Zenkova M. Multicomponent mannose-containing liposomes efficiently deliver RNA in murine immature dendritic cells and provide productive anti-tumour response in murine melanoma model // J. Control Release. – 2015. – V. 213. – P. 45–56.*

Работа выполнена при финансовой поддержке Проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210024-8 и грантом РНФ 19-14-00250.

МиРНК-направленные препараты на основе нуклеиновых кислот как эффективные ингибиторы канцерогенеза *in vitro* и *in vivo*

Мирошниченко С.К., Патутина О.А., Зенкова М.А.

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

В настоящее время одной из важнейших задач практической онкологии является поиск эффективных стратегий для терапии злокачественных заболеваний. Активно развивающимся, перспективным подходом является контроль и регуляция активности коротких некодирующих РНК, в частности, миРНК. Данные молекулы являются ключевыми регуляторами важнейших сигнальных каскадов клетки, ответственных за процессы пролиферации, апоптоза, миграции и инвазии. Экспрессия миРНК нередко нарушена при развитии патологических состояний, что делает их перспективными мишенями противораковой терапии.

В данной работе будут рассмотрены последствия нарушения экспрессии миРНК в клетках, приводящие к инициации и развитию ключевых событий канцерогенеза. Будут представлены результаты применения конструкций на основе нуклеиновых кислот, направленных на восстановление нормального уровня и функций миРНК, включая синтетические миРНК мимики, систему CRISPR/Cas9, малые РНК зипперы, миРНК спонжи, миРНК маски, анти-миРНК олигонуклеотиды и миРНКазы (миРНК-направленные искусственные рибонуклеазы). Будут освещены основные достижения комбинированной терапии онкопатологий, основанной на применении различных сочетаний миРНК-направленных препаратов, включая их комбинации с химиотерапией, для подавления опухолевого роста. Перспективность данного направления обеспечивается тем, что одновременное введение нескольких анти-миРНК олигонуклеотидов и/или синтетических миРНК мимиков, мультипотентных миРНК спонжей, направленных к различным миРНК, и совместное применение миРНК-направленных олигонуклеотидов и цитостатических препаратов многократно увеличивает эффективность противораковой терапии в силу аддитивного или синергического действия. При этом применение таких комбинаций обеспечивает более комплексный и глубокий эффект на различные события канцерогенеза по сравнению с монотерапией *in vitro* и *in vivo*. Вне всяких сомнений, различные сочетания миРНК-направленных препаратов, в том числе, с химиотерапией могут выступать в качестве прототипов схем лечений различных онкопатологий и других миРНК-ассоциированных заболеваний.

Работа была поддержана грантом Российского Научного Фонда № 19-74-30011.

Нуклеозиды: структура, синтез и биологическая активность

Михайлов С.Н.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Создание лекарственных препаратов на основе природных соединений является традиционным и высокопродуктивным подходом. К настоящему времени на основе нуклеозидов создано около ста лекарственных препаратов, половина антивирусных и четверть противоопухолевых лекарств являются производными нуклеозидов.

Природные нуклеозиды входят в состав ДНК, РНК и коферментов. Более 120 минорных нуклеозидов выделено из тРНК. В настоящее время известно около 100 дисахаридных нуклеозидов и около 200 нуклеозидных антибиотиков, которые имеют в своей структуре дополнительные функциональные группы и гидрофобные остатки. В целом библиотека природных нуклеозидов состоит приблизительно из 600 соединений и является перспективной основой для создания новых биологически активных соединений. В моем докладе будут приведены результаты работы нашей лаборатории по синтезу и изучению биологических свойств производных нуклеозидов.

Эта работа была поддержана Российским научным фондом (проект № 16-14-00178).

Изучение стабильности катионных липосом при хранении

Михеев А.А.[2], Шмендель Е.В.[1], Назаров Г.В.[2], Маслов М.А.[1]

[1] *Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия*
[2] *ФГУП «Научный центр «Сигнал», Москва, Россия*

В настоящее время при разработке средств доставки нуклеиновых кислот (НК) особое внимание уделяется невирусным векторам, что обусловлено их невысокой себестоимостью, низкой токсичностью и отсутствием иммуногенности. Среди невирусных систем доставки наиболее эффективными являются катионные липосомы.

Наилучшую эффективность при трансфекции эукариотических клеток *in vitro* продемонстрировали катионные липосомы на основе липида, содержащего два остатка холестерина, карбаматный линкер и спермин (липид 2Х3), в сочетании с липидом-хелпером DOPE (1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин) [1].

Липосомы как коллоидные системы имеют тенденцию к агрегированию при длительном хранении, что, в свою очередь, влечет за собой потерю трансфицирующих свойств. Изучение трансфицирующей активности катионных липосом состава 2Х3-DOPE в зависимости от срока хранения до настоящего времени не проводились.

В данной работе оценку трансфицирующей активности катионных липосом состава 2Х3-DOPE проводили при различных соотношениях положительно заряженных атомов азота катионного липида к отрицательно заряженным фосфатным группам плазмидной ДНК *pGLuc* (N/P). Эффективность трансфекции (ЭТ) оценивали по интенсивности люминесценции культуральной жидкости, обусловленной уровнем экспрессии репортерного гена *GLuc*, входящего в состав плазмидной ДНК *pGLuc* и кодирующего люциферазу морского рачка *Gaussia princeps*.

Было установлено, что после 6 месяцев хранения при температуре 4±2°С ЭТ плазмидной ДНК *pGLuc* с помощью липосом снизилась незначительно (~ в 1.5 раза) по сравнению с первоначальной. При этом размеры и ξ-потенциал липосом, измеренные до и после хранения, практически не различались. Следует отметить, что при изучении эффективности трансфекции были исследованы различные мольные соотношения катионных липосом состава 2Х3-DOPE. Катионные липосомы при мольном соотношении 2:1 оказались наиболее эффективными при доставке *pGLuc* в клетки HEK293. При этом они остаются более эффективными, чем коммерческий препарат Липофектамин 2000.

Таким образом, исследуемые катионные липосомы сохраняют трансфицирующую активность после длительного хранения, а следовательно, являются перспективными средствами доставки НК.

1. *Maslov M. A., Kabilova T. O., Petukhov I. A., Morozova N. G., Serebrennikova G. A., др. всего 7 человек. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA // Journal of Controlled Release. 2012. – V. 160. - P 182–193.*

Фоточувствительные направляющие олигорибонуклеотиды для контролируемого редактирования генома

Новопашина Д.С.[1,2], Хабардина Е.А.[2], Вохтанцев И.П.[2], Ким Д.В.[1], Жарков Д.О.[1,2], Веньяминова А.Г.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Технологии редактирования ДНК с помощью системы CRISPR/Cas9 открывают новые возможности использования этой системы в терапевтических целях. Актуальным в этом плане является создание новых подходов к лечению заболеваний, вызванных увеличением копий определенных генов, например, синдром Шарко-Мари-Тута (наследственная нейродегенеративная патология, причиной которой может служить лишняя копия гена периферического белка миелина PMP22) и синдром Дауна. Использование CRISPR/Cas9 системы для контролируемого уменьшения числа копий мультиплицированных генов является оригинальным подходом к лечению этих генетических заболеваний.

Одним из вариантов контроля за активностью олигонуклеотидных конструкций в клетках является использование фотоактивируемых структур в их составе. Основной идеей данной работы является введение в структуру направляющих РНК (sgРНК или crРНК/tracrРНК), входящих в состав системы CRISPR/Cas9, модификаций, позволяющих в определенный момент инактивировать эту РНК и прекратить действие системы редактирования генома.

Целью данной работы являлась разработка подхода к созданию модифицированных синтетических направляющих РНК, содержащих фоторасщепляемый линкер, которые можно будет использовать для контролируемого редактирования генов в составе CRISPR/Cas9 системы. В качестве фоторасщепляемых линкеров нами были использованы остатки 1-орто-нитрофенилэтиленгликоля.

Были получены аналоги sgРНК, crРНК и tracrРНК, содержащие одну или несколько фоторасщепляемых вставок в участках, комплементарных модельной ДНК-мишени, и/или в участках взаимодействия с белком Cas9. Исследована кинетика расщепления фоточувствительных направляющих РНК в растворе при УФ-облучении, подобраны оптимальные условия. В результате сравнительного исследования расщепления плазмидной ДНК системой CRISPR/Cas9 с использованием фоторасщепляемых направляющих РНК до и после УФ-облучения, продемонстрирована возможность контролируемого выключения этой системы.

Возможность получения протяженных функциональных РНК, в том числе и направляющих РНК, путем химического синтеза открывает путь к введению разнообразных модификаций в состав таких РНК. Введение фотоактивируемых вставок в ходе автоматического фосфитамидного синтеза по оптимизированному нами протоколу позволяет получать фоторасщепляемые направляющие РНК, облучение которых приводит к контролируемому выключению системы CRISPR/Cas9.

Полученные в работе результаты подтверждают перспективность предложенной стратегии рационального дизайна фотоконтролируемых систем редактирования генома.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-04-00838.

Внеклеточные везикулы и их аналоги как перспективные векторы для доставки терапевтических нуклеиновых кислот

Ощепкова А.Л., Неуместова А.И., Матвеева В.А., Артемьева Л.В., Марков О.В., Зенкова М.А., Власов В.В.

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

Современные препараты на основе нуклеиновых кислот имеют широкий потенциал для регуляции экспрессии генов и редактирования генома. Однако большинство описанных систем их введения в клетки ограничены высокой токсичностью, нестабильностью, низкой проникающей способностью или же не направленностью действия. В последние годы большой интерес стали вызывать природные системы доставки нуклеиновых кислот, основанные на применении внеклеточных везикул. Основными затруднениями, связанными с их использованием, являются отсутствие эффективных методов «нагрузки» лекарственными средствами и сложная процедура выделения и очистки.

В данной работе был исследован потенциал внеклеточных везикул, выделенных из кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток человека, а также первичной и иммортализованной культур дендритных клеток мыши, для переноса модельного ДНК-олигонуклеотида в различные типы клеток. Мы протестировали три метода «нагрузки» внеклеточных везикул (замораживание/оттаивание, обработка сапонином и воздействие ультразвуком), а также различные условия хранения везикул и обнаружили сходный уровень связывания ДНК-олигонуклеотида вне зависимости от используемого метода и условий хранения везикул. Мы также исследовали два аналога (МВ) природных внеклеточных везикул на предмет эффективности связывания ДНК-олигонуклеотида. Первый аналог был получен из фрагментов мембран разрушенных клеток, а второй - путем обработки клеток раствором цитохалазина В. Мы обнаружили, что предлагаемые подходы позволяют получать в 5-10 раз больше везикул. Кроме того, МВ более эффективно «нагружались» ДНК-олигонуклеотидом при использовании метода замораживания/оттаивания. Применение природных внеклеточных везикул и их аналогов для доставки ДНК-олигонуклеотида в HEK293 клетки человека в различных условиях продемонстрировало высокий потенциал цитохалазин-индуцированных везикул для доставки нуклеиновых кислот. Наблюдаемый уровень накопления олигонуклеотида в клетках был сходным с применением катионных липосом.

Исследование *in vitro* тропности цитохалазин-индуцированных везикул выявило, что МВ, полученные из дендритных клеток, эффективно проникают как в нормальные, так и в различные опухолевые клетки, а МВ, полученные из мезенхимальных стволовых клеток человека, были наиболее эффективны для трансфекции опухолевых клеток эпителиального происхождения.

Авторы выражают благодарность сотрудникам сектора структурной биологии клетки ИЦиГ СО РАН к.б.н. Киселевой Е.В. и к.б.н. Морозовой К.Н. за выполнение электронно-микроскопических исследований. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 17-04-01136) и Российского научного фонда (19-74-30011).

Амфифильные додецил-олигонуклеотидные конъюгаты как потенциальные средства для доставки нуклеиновых кислот в клетки

Павлова А.С., Купрюшкин М.С., Довыденко И.С., Григорьева А.Е., Пышная И.А., Пышный Д.В.

Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Использование синтетических конъюгатов нуклеиновых кислот (НК), содержащих остатки липидов или алифатических углеводородов, является одним из способов улучшения проникновения функционально значимых НК-конструкций в клетки [1-2]. Данные соединения характеризуются хорошей биологической совместимостью и вследствие своей амфипатичности способны к самоассоциации в водных растворах с образованием мицеллоподобных структур, как правило, сферической формы, чем представляют особенный интерес для исследователей [3].

В данной работе исследованы особенности самоассоциации олигодезоксирибонуклеотидов и их фосфорилгуанидиновых производных, содержащих на 5'- или 3'-конце додецильные группировки [4]. С помощью методов динамического рассеяния света, атомно-силовой и просвечивающей электронной микроскопии показано, что додецил-олигонуклеотидные конъюгаты (ДОК) в зависимости от условий способны к формированию мицеллоподобных структур, как сферической формы от 30 нм в диаметре, так и агрегатов большего размера. Продемонстрировано высокое сродство ДОК к белкам (на примере бычьего сывороточного альбумина) по сравнению с олигонуклеотидами, не содержащим гидрофобных додецильных группировок. Показано, что в условиях формирования мицеллоподобных структур интенсивность флуоресценции остатка 6-FAM, введённого в ДОК в различные положения относительно додецильных группировок, может значительно снижаться. Методом конфокальной микроскопии продемонстрирована способность ДОК к проникновению в клетки линии 143B.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о перспективах дальнейших разработок средств доставки НК-конструкций в клетки с использованием додецил-олигонуклеотидных производных.

1. *Karaki S., Benizri S., др. всего 10 человек. Lipid-oligonucleotide conjugates improve cellular uptake and efficiency of TCTP-antisense in castration-resistant prostate cancer // J. Control. Release. - 2017. - V. 258. - P 1-9.*
2. *Dovydenko I., Venyaminova A., др. всего 5 человек. Modifications in therapeutic oligonucleotides improving the delivery. In: Modified Nucleic Acids in Biology and Medicine. RNA Technologies. Springer, Cham // 2016. - P 319-337.*
3. *Shu Y., Yin H., др. всего 8 человек. RNA-based micelles: a novel platform for paclitaxel loading and delivery // J. Control. Release. - 2018. - V. 276. - P 17-29.*
4. *Kupryushkin M., Nekrasov M, др. всего 4 человека. Efficient functionalization of oligonucleotides by new achiral nonnucleosidic monomers // Org. Lett. - 2014. - V. 16. - P 2842-2845.*

Павлова А.С. выражает благодарность к.х.н. Шевелёву Г.Ю. за полезные консультации по проведению АСМ-анализа.

Исследование проведено при поддержке гранта РНФ № 18-14-00357.

Анти-miR-21 N-мезилфосфорамидный антисмысловой олигонуклеотид эффективно подавляет рост эпидермоидной карциномы человека *in vivo*

Патутина О.А.[1], Мирошниченко С.К.[1], Сенькова А.В.[1], Савин И.А.[1], Гладких Д.В.[1], Буракова Е.А.[1], Маслов М.А.[2], Шмендель Е.В.[2], Власов В.В.[1], Стеценко Д.А.[1], Зенкова М.А.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Многолетние исследования доказали, что антисмысловые олигонуклеотиды обладают мощным потенциалом для подавления экспрессии генов и некодирующих РНК, в частности миРНК, ассоциированных с различными патологическими состояниями. Применение олигонуклеотидов в биологических системах и в терапевтических целях требует введения химических модификаций в их структуру для улучшения их физико-химических и биологических свойств. Ранее нами был разработан и исследован новый тип модифицированных олигонуклеотидов (μ-олигонуклеотиды), содержащих мезилфосфорамидный остов, и было показано, что разработанные олигомеры демонстрируют высокую аффинность к РНК-мишени, исключительную устойчивость к нуклеазам, эффективный рекрутинг РНКазы Н. Биологический противоопухолевый потенциал μ-олигонуклеотидов, направленных к высоко онкогенной miR-21, успешно реализуется в культуре клеток, способствуя эффективному и специфическому ингибированию ключевых процессов канцерогенеза *in vitro* [1].

Данное исследование включает в себя изучении базовых характеристик μ-олигонулкеотидов в качестве противоопухолевых терапевтических средств i*n vivo*: изучение кинетики подавления опухоли, оценку основных критериев системной токсичности, изучение биораспределения и первичный анализ фармакокинетических параметров разработанных олигонуклеотидов. С использованием модели лекарственно-устойчивой эпидермоидной карциномы человека КВ-8-5 показано, что перитуморальное введение анти-miR-21 μ-олигонуклеотида в комплексе с фолат-содержащими катионными липосомами, в качестве доставляющего агента, обеспечивает эффективное накопление препарата в опухолевой ткани и приводит к 8-кратному подавлению роста первичной опухоли у мышей SCID. Морфометрическое исследование печени и почек, а также биохимический анализ крови показали, что μ-олигонуклеотиды не обладают выраженной токсичностью в отношении печени и почек. Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанные олигонуклеотиды являются новым мощным инструментом антисмысловой технологии.

1. *Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., et al. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties. // Proc. Natl. Acad. Sci U S A. - 2019. - V. 116. - P 1229–1234.*

Данная работа поддержана грантом РНФ № 19-14-00250 и проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210024-8.

Молекулярные основы формирования некомплементарных ассоциатов полинуклеотидов

Позмогова Г.Е., Северов В.В., Вахитова М.А., Варижук А.М., Цветков В.Б.

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

Геномные перестройки лежат в основе биологических механизмов широкого круга заболеваний (онкологических, нейродегенеративных и др.). В последние годы сложилась гипотеза о важной роли G/C–богатых фрагментов ДНК в процессах рекомбинации, транслокации, генерации разрывов ДНК. Особое внимание привлекают сайты ДНК, способные формировать пространственно затрудненные и стабильные в физиологических условиях неканонические (ncNA) вторичные структуры – G-квадруплексы и I-мотивы (G4 и IM). Мы исследовали ncNA-ассоциацию ДНК на уровне олигонуклеотидных моделей [1-2] и протяженных (~200 bp) природных и модельных ДНК дуплексов. Формирование межмолекулярных ncNA может приводить к конъюгации хромосом или дистальных фрагментов плазмид/хромосом (синапсис ДНК – первая фаза геномных аберраций). В исследовании IM/G4-ассоциатов был использован комплекс физико-химических, биоинформатических, генно-инженерных методов, оригинальные подходы к молекулярному моделированию динамики ДНК-комплексов, новые синтетические производные олигонуклеотидов, АСМ высокого разрешения. В результате описаны закономерности формирования и определены структуры супрамолекулярных IM, показана возможность их управляемой сборки и модуляции pH-переходов [2-3]. Проанализирован структурный полиморфизм различных G4-ассоциатов [1]. Экспериментально продемонстрирована возможность участия G-богатых фрагментов геномов человека и бактерий в спонтанном синапсисе ДНК. Сравнение сайтов рекомбинации и G4-сайтов шести различных геномов бактерии *Streptococcus pyogenes* показало не только консервативность G4-сайтов, но и высокую степенью сходства их окружения (± 200 bp), что аргументируют возможность *in vivo* реализации предложенного механизма G4-синапсиса и его участия в рекомбинационных процессах. Полученные данные позволяют углубить представления о молекулярных основах полинуклеотидных перегруппировок с участием ncNA сайтов. Найденные закономерности важны для разработки новых ДНК-лекарств, биосенсеров и диагностикумов.

1. *Varizhuk, A.M., et al. Polymorphism of G4 associates: from stacks to wires via interlocks. Nucleic Acids Research, 46 (17): 8978-8992. (2018).*
2. *Protopopova, A.D., et al. The structural diversity of C-rich DNA aggregates: unusual self-assembly of beetle-like nanostructures. Physical Chemistry Chemical Physics 20, 3543-3553 (2018).*
3. *Tsvetkov, V.B., et al. i-Clamp phenoxazine for the fine tuning of DNA i-motif stability. Nucleic Acids Research 46, 2751-2764 (2018).*

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 14-25-00013) и РФФИ (грант № 19-015-00024).

Ретровирусы и ретровирусные векторы. Новое о старом.

Прасолов В.С., Спирин П.В., Лебедев Т.Д., Шульгин А.А., Вагапова Э.Р.

Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

Ретровирусы и сконструированные на их основе векторы – мощные инструменты исследований в современной биологии. Открытие обратной транскрипции, осуществляемой ретровирусным ферментом ревертазой (обратной транскриптазой) является знаковым событием, существенным, как для фундаментальной биологии, так и для ее прикладных направлений, в первую очередь, биотехнологии и биомедицины.

Ретровирусные векторы широко используются как для эктопической экспрессии целевых и маркерных генов в клетках млекопитающих, в том числе и человека, так и для внесения в клетки генетических конструкций, обеспечивающих подавление экспрессии определенных генов или редактирование генома.

Особый интерес представляют эндогенные ретровирусы, составляющие значительную долю геномов млекопитающих. Выделенные нами эндогенные ретровирусы из мышевидных грызунов *Mus cervicolor* и *Mus caroli* для проникновения в клетки при заражении используют клеточные трансмембранные белки, рецепторная функция которых была ранее неизвестна. Обсуждается возможность использования белков оболочки ретровирусов для адресной доставки терапевтических генов.

Исследование было поддержано грантом РФФИ №17-29-06049.

Дисульфидные поликатионные амфифилы для доставки терапевтических нуклеиновых кислот: связь структура-активность

Пучков П.А.[1], Шмендель Е.В.[1], Лунева А.С.[1], Зенкова М.А.[2], Маслов М.А.[1]

[1] *Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия*
[2] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Невирусные системы доставки являются перспективными переносчиками терапевтических нуклеиновых кислот (ТНК) в эукариотические клетки за счет большей безопасности и меньшей стоимости в сравнении с вирусными системами. Недостатком невирусных систем является их низкая эффективность транспорта ТНК. В случае катионных липосом ключевую роль играет структура амфифилов, используемых в составе липосом. Для повышения эффективности доставки в молекулу амфифила вводят стимул-чувствительные группы, например дисульфидные, которые способствуют высвобождению ТНК внутри клетки, увеличивая терапевтическое действие НК.

Ранее нами был получен димерный поликатионный амфифил 2X3 на основе природных компонентов – спермина и холестерина. Катионные липосомы на его основе показали высокую способность доставки различных типов ТНК [1,2]. Затем были разработаны его аналоги 2S3 и 2S4, которые содержат дисульфидные группы в разных частях амфифильной молекулы (в спейсере или в гидрофобном домене, соответственно). Дисульфидная группа должна разрушаться под действием внутриклеточных восстановителей, что приведет к высвобождению ТНК в цитоплазму клетки. При этом, расположение дисульфидной группы в молекуле амфифила может влиять на свойства катионных липосом.

Целью данной работы явилось изучение влияния расположения дисульфидных групп в молекулах поликатионного амфифила на их физико-химические свойства и трансфицирующую активность. Для оценки чувствительности липосом и их комплексов с ТНК к восстановлению были использованы различные дестабилизирующие агенты, такие как глутатион, 1,4-дитиотреитол и гепарин. Нами проводилась оценка размеров, дзета-потенциалов и трансфицирующей активности липосом и липоплексов в присутствии/отсутствии указанных агентов. Липосомы на основе амфифила 2S3 с дисульфидными группами, расположенными в спейсере, оказались более чувствительными к действию дестабилизирующих агентов, чем липосомы с 2S4, у которого дисульфидные группы расположены в гидрофобных доменах.

1. O.O. Markov et al., J. Control. Release, 2012, 160, 200;
2. M.A. Maslov et al., J. Control. Release, 2012, 160, 182;

Исследование было поддержано грантом РНФ № 18-73-00270.

Противоопухолевое, иммуностимулирующее и гепатотоксическое действие исРНК при сочетанном применении с цитостатиком дакарбазином на модели меланомы мыши

Савин И.А., Сенькова А.В., Кабилова Т.О., Зенкова М.А., Черноловская Е.Л.

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

Меланома является одной из самых высокоагрессивных опухолей, ее развитие сопровождается индукцией в организме системного воспалительного ответа, аутоиммунных реакций, а также токсического поражения печени [1]. В связи с этим при лечении данного вида неоплазий широко используют комбинации химиотерапевтических агентов с иммунотерапией [2]. Использованная в данном исследовании малая интерферирующая РНК обладает выраженным противоопухолевым и иммуностимулирующим действием (исРНК) [3].

Целью исследования было оценить противоопухолевое, иммуностимулирующее и гепатотоксическое действие исРНК, как в режиме монотерапии, так и при сочетанном применении с цитостатиком дакарбазином на модели меланомы B16.

Показано, что исследуемые препараты эффективно подавляют рост меланомы B16: на 10-е сутки после трансплантации индекс торможения роста опухоли составил 14.5%, 55.3% и 93.8% при лечении дакарбазином, исРНК и их комбинацией. Далее этот показатель продолжал повышаться во всех группах и на 17-е сутки роста опухоли составил 78.3%, 98.1% и 99.7%, соответственно.

При морфометрическом и иммуногистохимическом исследовании опухолевых узлов было обнаружено нарастание деструктивных (апоптотических и некротических) изменений и лимфоидной инфильтрации, а также снижение митотической активности опухоли как при введении исРНК и дакарбазина в режиме монотерапии, так и при сочетанном их применении. В селезенке были обнаружены признаки активации иммунной системы: увеличение числа и диаметра лимфоидных фолликулов, увеличение объемной плотности белой пульпы. В печени животных с меланомой B16 без лечения были выявлены деструктивные изменения, составившие около 30% от всей паренхимы. Введение исРНК в сочетании с дакарбазином не вызывало нарастания деструкции, однако стимулировало регенеративную активность в печени животных-опухоленосителей.

Таким образом, сочетанное применение исРНК и цитостатика дакарбазина эффективно подавляет рост меланомы B16 и не оказывает дополнительного повреждающего воздействия на печень.

1. *Eggert T., Medina-Echeverz J., Kapanadze T. et al. Tumor induced hepatic myeloid derived suppressor cells can cause moderate liver damage. // PLoS One. - 2014. - V. 9(11): e112717.*
2. *Wilson M.A., Schuchter L.M. Chemotherapy for Melanoma. // Cancer Treat. Res. - 2016. - V. 167.- P. 209-229.*
3. *Kabilova T.O., Sen'kova A.V., Nikolin V.P. et al. Antitumor and antimetastatic effect of small immunostimulatory RNA against B16 melanoma in mice // PLoS One. - 2016. - V. 11(3): e0150751.*

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №19-74-30011 и проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210024-8.

Изменения экспрессии генов, индуцируемые аналогами днРНК *GAS5* в клетках человека

Семенов Д.В.[1], Савиновская Ю.И.[1], Зинченко Н.Д.[1,2], Савельева А.В.[1], Нуштаева А.А.[1], Коваль О.А.[1,2], Немудрая А.А.[1], Кулигина Е.В.[1], Степанов Г.А.[1], Рихтер В.А.[1]

[1] *ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, НГУ, Новосибирск, Россия*

Ген *GAS5* человека транскрибируется РНК-полимеразой II с образованием пре-днРНК, интроны которой процессируются с образованием 10 малых ядрышковых C/D-бокс РНК, а экзоны формируют набор полиаденилированых транскриптов, биологические функции которых в настоящее время не установлены. Известно, что понижение уровня зрелых полиаденилированных изоформ днРНК *GAS5* в клетках злокачественных опухолей человека является индикатором прогрессии и метастазирования опухоли. Повышение уровня днРНК *GAS5* связано с подавлением пролиферации, снижением жизнеспособности и апоптотической гибелью онкотрансформировнных клеток в культуре. Поэтому днРНК *GAS5* является перспективным объектом для разработки средств диагностики и терапии онкологических заболеваний человека.

Для того, чтобы описать механизм действия днРНК *GAS5* в данной работе были сконструированы и получены векторы, экспрессирующие изоформы днРНК *GAS5* в клетках человека. Установлено, что трансфекция фибробластов HEK293, аденокарциномы легкого A549 и аденокарциномы молочной железы человека полученными векторами сопровождается эктопической эксперссией изоформ днРНК *GAS5*. Эктопическая экспрессия изоформ днРНК *GAS5* сопровождалась снижением жизнеспособности клеток человека.

Полнотранскриптомным анализом дифференциальной экспрессии генов было установлено, что трансфекция клеток A549, MCF-7 и HEK293 *GAS5*-экспрессирующими плазмидами сопровождается ранними (8 ч) изменениями уровней наборов мРНК. При этом наборы дифференциально экспрессируемых мРНК существенно различались для разных культур клеток человека. Биоинформационный анализ данных полнотранскриптомного исследования позволил выявить общие характеристики наборов дифференциально экспрессируемых генов, такие как: контроль транскрипционными факторами семейства MAX; участие в воспалительных процессах, опосредованных хемокинами и цитокинами; а также участие в апоптотических процессах. В совокупности полученные данные позволяют предложить новый механизм регуляции экспрессии генов с участием днРНК *GAS5*.

Работа была поддержана грантом РНФ № 16-14-10284 и проектом базового бюджетного финансирования Минобрнауки РФ № 0245-2019-0001.

Молекулярные модели воспаления, иммуносупрессии и опухолевого роста

Сенькова А.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

В настоящее время доказана связь между воспалением, опухолевой трансформацией, а также нарушением иммунной системы. Хроническое воспаление является основным источником инициации эпителиально-мезенхимального перехода и последующей опухолевой прогрессии [1]. В свою очередь развитие опухоли сопровождается нежелательными иммунными нарушениями, которые приводят к уклонению опухоли от иммунного надзора [2]. Это усугубляет хроническое воспаление и дальнейшие сбои иммунной системы [3, 4].

Для поиска связи молекулярных маркеров воспаления, иммуносупрессии и онкотрансформации, а также мишеней для коррекции этих патологических состояний могут быть использованы экспериментальные модели на животных.

Экспериментальные модели заболеваний на животных позволяют изучать биологическую активность и терапевтический потенциал разрабатываемых препаратов на релевантных моделях опухолевой прогрессии и моделях острого и хронического воспаления in vivo и сопоставить результаты фундаментальных исследований с клинической картиной соответствующего заболевания.

В докладе будут рассмотрены ряд экспериментальных моделей на животных, в которых процессы воспаления, иммуносупрессии и опухолевого роста тесно взаимосвязаны: колит и колит-ассоциированный рак, астма и ЛПС-индуцированное поражение легких с последующим фиброзом и модели высокоагрессивных метастазирующих опухолей различного генеза, а также будут обсуждены проблемы их использования и интерпретации полученных данных.

1. *Suarez-Carmona M., Lesage J., Cataldo D., Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. // Mol. Oncol. - 2017. - V. 11(7). - P. 805-823.*
2. *Curtale G. MiRNAs at the crossroads between innate immunity and cancer: focus on macrophages. // Cells. - 2018. - V. 7(2). - pii: E12. doi: 10.3390/cells7020012.*
3. *Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. // Cell. - 2010. - V. 140(6). - P. 883-899.*
4. *Shalapour S., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. // J. Clin. Invest. - 2015. - V. 125(9). - P. 3347-55.*

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №19-74-30011 и проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210024-8.

Роль рецепторной тирозинкиназы KIT при злокачественных заболеваниях крови

Спирин П.В., ВагаповаЭ.Р., Лебедев Т.Д., Прасолов В.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт Молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Лейкозы представляют собой гетерогенную группу злокачественных заболеваний крови. Значительную часть лейкозов, наиболее плохо поддающуюся терапии, составляют острые миелоидные лейкозы (ОМЛ). Считают, что лейкозы имеют клональную природу и их возникновение связано с возникновением молекулярно-генетических аномалий в кроветворной клетке-предшественнице (стволовая кроветворная клетка). Это ведёт к глобальному изменению активности сигнальных каскадов в клетке, ответственных за нормальный рост, развитие и дифференцировку клеток кроветворного ряда. В конечном итоге, такие трансформированные клетки отличаются повышенной аномальной способностью к пролиферации, не дифференцируются и их рост приводит к вытеснению нормальных ростков кроветворения, нарушению функций кроветворной и иммунной системы. Причины злокачественного перерождения при ОМЛ в полной мере не изучены, точно также как и механизмы связанные с развитием резистентности к терапии и механизмы возникновения рецидивов. Существенный интерес для объяснения этих событий представляет изучение роли рецепторной тирозинкиназы KIT, высокий уровень экспрессии которой характерен для клеток ОМЛ. Известно, что появление точечных мутаций в гене, кодирующем данный белок связаны с развитием лейкозов, однако роль повышенной экспрессии не мутантной формы KIT остаётся не ясной. Мы исследовали, как подавление экспрессии KIT меняет баланс сигнальных каскадов, ассоциированных со злокачественным перерождением клеток, и выявили те из них, которые могут быть сопряжены с развитием резистентности к терапевтическим ингибиторам KIT, в частности к иматинибу.

Исследование было поддержано грантами РФФИ № 17-04-01555 (получение трансгенных клеточных линий), РФФИ № 19-34-80029 (проведение функциональных исследований).

Изучение эффектов CRISPR/Cas9-направленного нокаута малых ядрышковых C/D-бокс-РНК в клетках человека

Матвеева А.М.[1,2], Филиппова Ю.А.[1], Журавлев Е.С.[1], Семенов Д.В.[1], Балахонова Е.А.[1], Прохорова Д.В.[1], Маланин С.Ю.[3], Григорьева Т.В.[3], Рихтер В.А.[1], Власов В.В.[1], Степанов Г.А.[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Сибирское отделение Российской Академии наук, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*
[3] *Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Малые ядрышковые C/D-бокс-РНК (мяоРНК) за счет наличия консервативных элементов в своей структуре участвуют в пост-транскрипционном созревании рибосомных РНК и направляют сайт-специфичное 2'-О-метилирование нуклеотидов РНК-мишеней. В качестве объекта исследований в работе были выбраны C/D-бокс-мяоРНК, закодированные в интронах гена длинной некодирующей РНК Gas5. Благодаря наличию последовательностей PAM вблизи функциональных элементов удалось сконструировать протоспейсеры и направить разрывы в последовательности *SNORD74, SNORD75, SNORD77* и *SNORD80* с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9. Для моноклональных клеточных линий, полученных на основе фибробластов 293FT, был проведен анализ мутаций в выбранных участках гена *GAS5*, выявлены изменения в уровне мяоРНК-мишеней и их функциональной активности – удалось получить линии с подавленной активностью индивидуальной U74, U75 и U80 C/D-бокс-мяоРНК.

Транскриптом полученных клеточных линий исследовали с применением методов массового параллельного секвенирования – были проведены этапы стандартного RNA-Seq-анализа polyA фракции и коротких форм РНК, включая мяРНК, микроРНК и мяоРНК. Результаты анализа подтвердили селективность действия системы редактирования в отношении выбранных малых ядрышковых РНК. Анализ структуры РНК гена-хозяина выявил частичные изменения в структуре зрелой формы Gas5 – образование форм с пропуском экзонов и формирование дополнительных неканонических стыков экзонов. Данные RNA-Seq-анализа polyA фракции продемонстрировали изменение экспрессии большого числа генов, однако, не выделялись группы, связанные с путями программируемой клеточной гибели.

Таким образом, была продемонстрирована возможность получения жизнеспособных клеточных линий с нокаутом единичных малых ядрышковых РНК для исследования неканонических функций индивидуальных мяоРНК, в том числе и роли в регуляции экспрессии генов, изучения процессов пост-транскрипционного созревания рибосомных РНК и сборки рибосом.

Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ 18-29-07073.

Транспортные олигонуклеотиды, содержащие гидрофобные остатки, в качестве новой системы доставки нуклеиновых кислот

Марков О.В.[1], Филатов А.В.[1], Купрюшкин М.С.[1], Струнов А.А.[2], Пышный Д.В.[1], Зенкова М.А.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия*

Способность антисмысловых олигонуклеотидов (asON) выключать целевые гены позволяет рассматривать их в качестве перспективных терапевтических агентов. Однако биологическая активность asON снижается за счёт относительно слабого проникновения в клетки. Кроме того, пока не полностью решена проблема доставки asON с нейтрально заряженным остовом, несущим, к примеру, фосфорил-гуанидиновую модификацию. Поэтому разработка эффективной системы доставки для asON остаётся важной задачей.

В настоящем исследовании была апробирована новая система доставки asON, представляющая собой комплементарный asON транспортный олигонуклеотид (tON), несущий на 5' конце один - три додецильных остатка, которые были введены в tON через диамидную ненуклеотидную вставку (TD1, TD2 и TD3), либо по межнуклеотидным фосфатным группам (TP1, TP2 и TP3 - олигонуклеотиды содержащие один, два и три додецильных остатка, соответственно).

В качестве asON были использованы как обычные олигодезоксирибонуклеотиды (asON-PO), так и их фосфотиоатный (asON-PS) и фосфорил-гуанидиновый (asON-PX) аналоги.

Показано, что tON имеют низкую цитотоксичность и не индукцирует апоптоз. TD3 и TP3 наиболее эффективно доставляли в клетки HEK293, A549 и KB 8 5, как asON-PO, так и модифицированные олигонуклеотиды asON-PS и asON-PX. tON с двумя или одним додецильным остатком показали существенно более низкую трансфекционную активность.

Кинетика накопления в клетках дуплексов TD3/asON и TD2/asON различалась: TD3/asON обнаруживался в 100% клеток KB-8-5 через 1 ч после трансфекции. TD2/asON накапливался в 100% клеток только через 4-8 ч. В обоих случаях asON оставался в клетках на протяжении 24 ч. (предельное время наблюдения).

Примечательным является тот факт, что после накопления в клетках максимального количества TD3/asON (4 ч) происходит резкое снижение внутриклеточных концентраций и TD3, и asON. В случае TD2/asON подобных изменений динамики не было – TD2 накапливался со стабильно низкой интенсивностью, тогда как уровень asON постепенно увеличивался на протяжении 24 ч., и в конечном итоге достиг значений близких к уровню доставки asON, опосредованной TD3. Мы показали, что снижение интенсивности накопления TD3-содержащих дуплексов связано с их активным выходом из клеток в составе внеклеточных везикул.

Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанные транспортные олигонуклеотиды могут быть перспективной системой доставки олигонуклеотидов с модифицированным остовом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210024-8 и РНФ 19-74-30011.

Конструирование высокоэффективных ингибиторов экспрессии генов на основе малых интерферирующих РНК

Черноловская Е.Л.

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

Препараты на основе нуклеиновых кислот представляют собой новый класс фармацевтических препаратов, наиболее подходящий для лечения сложных многофакторных заболеваний и представляющий большие возможности для персонализированной медицины. Наиболее эффективными агентами для направленного подавления экспрессии генов, действующими в наномолярных концентрациях, являются siРНК (малые интерферирующие РНК, действующие по механизму РНК интерференции. siРНК представляют собой дуплексы длиной 21-25 п.н., которые в составе белкового комплекса RISC (RNA-induced silencing complex) связываются с комплементарной им РНК-мишенью и вызывают ее направленную деградацию. siРНК нашли широкое применение в функциональной геномике, а также испытываются как перспективные терапевтические средства. В докладе будут рассмотрены проблемы конструирования высокоэффективных siРНК для их использования в качестве потенциальных лекарственных препаратов и описанные в литературе успешные примеры их решения.

Особое внимание будет уделено решению проблемы низкой стабильности siРНК в присутствии рибонуклеаз сыворотки, для решения которой используются химически модифицированные аналоги siРНК. Для увеличения нуклеазоустойчивости siРНК используются модификации, затрагивающие 2'-положение рибозы, 5'-концевой фосфат, межнуклеозидные фосфаты.

Другой актуальной проблемой является проблема доставки siРНК в клетки и ткани *in vivo*. Будет рассмотрен ряд методов, позволяющих облегчить проникновение нуклеиновых кислот в клетки: путем формирования комплексов нуклеиновых кислот с катионными липидами и поликатионами, путем использования вирусных векторов и липосом, путем применения физических методов, таких как электропорация. Для обеспечения биодоступности siРНК *in vivo* используются два основных подхода: образование комплексов с различными частицами и полимерами и образование биоконъюгатов с липофильными молекулами, антителами, аптамерами и амфифилами. Многочисленные факторы, такие как деградация эндогенными нуклеазами «разбавление» при делении клеток и неэффективное освобождение из состава систем доставки и из эндосом, являются основными причинами снижения эффективности и продолжительности терапевтического действия.

К настоящему времени удалось успешно решить проблему доставки ТНК в печень: недавно FDA был утвержден первый препарат на основе siРНК – Onpattro (Patisiran), разработанный компанией Alnylam. Этот препарат представляет собой химически модифицированную siРНК, инкапсулированную в липидные наночастицы, и предназначен для лечения полинефропатии при трансферрин-ассоциированном амилоидозе.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 19-14-00251.

Расщепление онкогенных микроРНК под действием комплементарно-адресованных двойных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов

Чиглинцева Д.А.[1], Патутина О.А.[1], Биченкова Е.В.[2], Миронова Н.Л.[1], Власов В.В.[1], Зенкова М.А.[1]

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
2 Университет Манчестера, Манчестер, Великобритания

МикроРНК (миРНК), являясь классом мощных регуляторных молекул, отвечают за регулирование основных биологических процессов, включая дифференцировку, апоптоз, пролиферацию, миграцию, инвазию и иммунный ответ. Нарушение экспрессии миРНК наблюдается при множестве патологических процессов, таких как неврологические расстройства, воспалительные и аутоиммунные состояния, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания.

Новой перспективной стратегией, направленной на инактивацию избыточных онкогенных миРНК, может стать разработка и применение сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз. Эти соединения представляют собой конъюгаты, состоящие из адресующего олигонуклеотида, избирательно связывающегося с миРНК-мишенью, и ковалентно присоединенной расщепляющей группы, катализирущей деградацию РНК.

В данной работе разработаны и исследованы миРНК-направленные конъюгаты нового поколения – двойные конъюгаты – Dual Conjugates (DC), в которых расщепляющий пептид на основе чередующихся остатков аргинина, лейцина и глицина $(LRLRG)_2$ расположен между двумя короткими миРНК-адресующими олигодезоксирибонуклеотидами. Уникальность разработанных конъюгатов заключается в том, что в последовательностях олигонуклеотидов аденины были заменены на 2-аминоаденины, что существенно повысило эффективность комплексообразования с миРНК-мишенью. Показано, что разработанные DC, направленные к онкогенным миРНК-17, миРНК-18a, миРНК-21 и миРНК-155, способны связывать и расщеплять миРНК-мишень с эффективностью до 65% за 48 ч инкубации. При этом DC проявляют пиримидин-Х специфичность расщепления, предпочитая связи C-A и U-A в образующемся при связывании одноцепочечном участке РНК. Установлено, что в присутствии РНКазы H в концентрации 5 ед. акт./мл эффективность расщепления миРНК-мишеней конъюгатами возрастает на 40%, при этом эффективность расщепления миРНК в комплексе с DC на 25% выше, чем в дуплексе с антисмысловым олигонуклеотидом. Исследование биологической активности конъюгатов выявило, что двойные конъюгаты способны снижать уровень миРНК-мишеней в опухолевых клетках KB-8-5 *in vitro* до 70% по сравнению с интактными клетками.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210024-8 и Российского научного фонда № 19-14-00250.

СИМПОЗИУМ
«БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ»

Регенеративная терапия экспериментальной спинальной травмы у приматов с помощью нейральных прогениторных клеток и многокомпонентного матрикса

Баклаушев В.П.[1], Богуш В.Г.[2], Дуров О.В.[1], Кальсин В.А.[1], Ким С.В.[1], Гулаев Е.В.[1]

[1] *ФГБУ ФНКЦ ФМБА России*
[2] *НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика*

В эксперименте на нечеловекообразных приматах (*Macaca mulatta*) с экспериментальной спинальной травмой исследовали биосовместимость и эффективность разработанного нами многокомпонетного матрикса SPRPix, включающего плазму, обогащенную тромбоцитами, нейральные прогениторные клетки человека и анизотропный скаффолд из рекомбинатных спидроинов 1 (rS1/9) и 2 (rS2/12) типа, а также поликапролактона. Предварительно в экпериментах *in vitro* было показано, что в составе матрикса SPRPix нейральные прогениторные клетки хорошо выживают и подвергаются нейрональной дифференцировке с образованием длинных βIII-тубулин и MAP2 позитивных отростков, ориентированных в соответствии с направлением фибрилл анизотропного скаффолда. Трансплантация SPRPix в головной и спинной мозг интактным обезьянам показала хорошую биосовместимость с отсутствием микроглиальной и астроцитарной реакции. При этом наблюдалось хорошее выживание трансплантированных клеток с признаками как нейрональной, так и глиальной дифференцировки. Обсуждаются варианты дальнейшего исследования разработанного матрикса для терапии экспериментальной спинальной травмы.

1. *Baklaushev VP, Durov OV, Kim SV, et al. Development of a motor and somatosensory evoked potentials-guided spinal cord Injury model in non-human primates. J Neurosci Methods. 2019 Jan 1;311:200-214.*
2. *Baklaushev VP, Bogush VG, Kalsin VA, et al. Tissue Engineered Neural Constructs Composed of Neural Precursor Cells, Recombinant Spidroin and PRP for Neural Tissue Regeneration. Sci Rep. 2019 Feb 28;9(1):3161.*

Исследование было поддержано грантом РНФ № 16-15-10432.

Экзосомы и белковые комплексы плаценты человека: структура и биологическая роль

Буркова Е.Е., Невинский Г.А.

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

Плацента – провизорный орган, обеспечивающий развитие и защиту плода на протяжении всего периода беременности. Все взаимодействия в системе мать-плод регулируются и контролируются плацентой. Плацента осуществляет регуляцию обмена веществ, а также синтез различных соединений, необходимых для нормального протекания беременности и подготовки организма матери к родам.

Многочисленные биологические функции плаценты осуществляются не только индивидуальными белками, но и сложными надмолекулярными комплексами. При этом активности комплексов могут значительно отличаться от активностей индивидуальных белков. Способность образовывать комплексы свойственна многим белкам плаценты.

Белки плаценты человека и их комплексы могут транспортироваться к другим органам и клеткам матери с помощью экзосом. Экзосомы представляют собой нановезикулы размером 40–100 нм, которые выделяются клеткой во внеклеточное пространство. В настоящее время установлено, что экзосомы плаценты участвуют в процессах регуляции иммунного ответа во время беременности – предотвращают отторжение плода. Экзосомы содержат различные белки, РНК и липиды, которые играют ключевую роль в осуществлении биологических функций нановезикул. Следовательно, характеризация белковых комплексов и экзосом плаценты является важным шагом в исследовании функций плаценты.

Целью настоящей работы являлось выделение и характеризация экзосом и высокомолекулярных белковых комплексов плаценты человека.

В плаценте человека обнаружен стабильный высокомолекулярный белковый комплекс. Основными белками комплекса являются серотрансферрин, сывороточный альбумин, актин и иммуноглобулины класса G. Показано, что белковый комплекс содержит РНК. Стабильный белковый комплекс обладает ДНКазной, РНКазной, АТФазной, фосфатазной, протеолитической, амилолитической, каталазной, пероксидазной и оксидоредуктазной активностями. Кроме того обнаружено, что белковый комплекс плаценты подавляет рост раковых клеток.

В работе также разработан протокол выделения экзосом из плаценты человека. Показано, что высокоочищенные экзосомы плаценты содержат не только крупные белки (> 10 кДа), но и пептиды и малые белки (2–12 кДа).

Исследование структуры и свойств экзосом и стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты позволит изучить новые биологические функции, которые реализуются на надмолекулярном уровне.

Работа поддержана грантом РНФ № 18-74-10055.

Биораспределение экзосом при различных режимах введения в эксперименте *in vivo*

Верлов Н.А., Штам Т.А., Бурдаков В.С., Сорока Н.В., Коневега А.Л.

НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ

Экзосомы с момента их открытия являются перспективным объектом для доставки лекарственных средств. Чтобы установить, можно ли использовать экзосомы для эффективной доставки лекарств, необходимо подробно изучить их биораспределение при различных режимах введения в экспериментах *in vivo*. В настоящей работе сравнивались интраназальный (ИН) и внутривенный (ВВ) режимы введения. Для исследования биораспределения экзосом экзосомы, выделенные из крови, были помечены I125. Разработанный метод мечения, основанный на связывании свободного радиоактивного йода, полученного методом изотопного обмена из йодида натрия, позволяет метить как поверхность экзосом, так и проводить нагрузку экзосом радиоактивной меткой. Суммарная доза помеченных экзосом, после отмывки от свободного йода, позволяла достоверно оценивать количество экзосом накопившихся в органах и тканях животных. В эксперименте использовались самцы мышей SHR (филиал ФГБУН НЦБМТ ФМБА России питомник «Столбовая») массой 24-28 гр., измерение дозы, накопленной в тканях органов животных, проводилась через два часа после введения на сцинтилляционном счетчике и нормировалась на массу исследуемого образца. Для анализа брались из организма животного измывались образцы следующих тканей: кровь, часть мышцы бедра, образец кожи. Сердце, лёгкое, печень, селезёнка, почки и головной мозг брались полностью для последующих измерений. После расчета удельной дозы, накопленной в каждом из образцов, проводилось нормирование показателя на удельную дозу в крови для каждого из исследуемых животных. Было показано, что при интраназальном и внутривенном введениях сердце (ИН:55±2,8%; ВВ: 57±8,4%) и лёгкое (ИН:70±16,8%; ВВ:65±15,7%) обладают идентичной биодоступностью (относительно концентрации экзосом в крови). Достоверные отличия наблюдали в биораспределении в тканях мышцы бедра (ИН:32±8,6%; ВВ: 9±0,5%), печени (ИН:30,9±1,5%; ВВ: 40±2,3%), почки (ИН:93±4,3%; ВВ: 33±3,3%), селезёнки (ИН:57±7,5%; ВВ: 31±5,4%) и образцах ткани кожи (ИН:79±10,2%; ВВ: 21±1,4%). Было показано, что при интраназальной доставке экзосом их относительная доля, доставленная в ткани мозга выше, чем при внутривенном введении (ИН:8±0,7%; ВВ: 5,7±1,6%), однако относительная накопленная доза относительно других тканей организма при обоих режимах введения остаётся небольшой.

2'-F-РНК-аптамеры к белковым биомаркерам: селекция и биоаналитическое применение

Воробьева М.А.[1], Чаукина В.В.[1], Давыдова А.С.[1], Красицкая В.В.[2], Башмакова Е.Е.[2], Воробьев П.Е.[1,3], Кабилов М.Р.[1], Невинский Г.А.[1], Аброськина М.В.[4], Ильминская А.А.[4], Франк Л.А.[2], Веньяминова А.Г.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт биофизики СО РАН ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия*
[3] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*
[4] *Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия*

Аптамеры – относительно короткие фрагменты ДНК или РНК, способные связывать молекулы-мишени с высокой аффиностью и специфичностью. Уникальными достоинствами аптамеров являются широкий спектр потенциальных мишеней, возможность химического синтеза и введения разнообразных химических модификаций. Эти свойства обусловили их востребованность в качестве биоузнающих элементов при создании специфичных и высокочувствительных биосенсоров. Нами получен ряд новых 2'-F-РНК-аптамеров к белкам крови человека - биомаркерам различных заболеваний, и созданы биолюминесцентные биосенсоры на их основе. В качестве биолюминесцентного репортера был использован Ca2+-зависимый фотопротеин обелин, который обеспечивает быструю и чувствительную детекцию аналитов.

Аптамеры к аутоантителам, характерным при рассеянном склерозе (РС), были использованы для создания микропланшетной сэндвич-системы биолюминесцентной детекции в образцах из сыворотки крови пациентов с РС и здоровых доноров. Разработанный метод представляет значительный интерес для исследования диагностического потенциала аутоантител при РС и их роли в патогенезе заболевания.

Получены и охарактеризованы 2'-F-РНК-аптамеры к гемоглобину человека и его гликированной форме HbA1c – одному из наиболее распространенных биомаркеров сахарного диабета. В модельной системе показана возможность использования полученных аптамеров для биолюминесцентной детекции гемоглобина и гликогемоглобина в одном образце.

Предложена новая стратегия для нековалентного введения биолюминесцентного репортера в аналитическую систему, основанная на использовании аптамера со сродством к обелину. Данный способ введения обелина не требует ковалентного конъюгирования белка или создания химерных белковых конструкций. Получен 2'-F-РНК-аптамер к обелину, оптимизирована его структура. Сконструированы бифункциональные аптамеры с двойной специфичностью гемоглобин/обелин, на их примере показана возможность использования предложенного подхода для биолюминесцентной детекции гемоглобина. Данный подход в перспективе может быть использован при создании биолюминесцентных аптасенсоров, специфичных к другим белковым биомаркерам.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 16-14-10296 и проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН № АААА-А17-117020210021-7 (ИХБФМ СО РАН).

Пространственная структура биолюминесцентных белков: фундаментальные и прикладные аспекты

Высоцкий Е.С., Маркова С.В., Наташин П.В., Буракова Л.П., Еремеева Е.В., Маликова Н.П.

Лаборатория фотобиологии, Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

Биолюминесценция – явление, широко представленное в природе. Светящиеся организмы встречаются среди бактерий, грибов, простейших, кишечнополостных, червей, моллюсков, насекомых и рыб. В настоящее время насчитывается несколько тысяч биолюминесцентных видов среди представителей более чем 700 родов. Исследования биолюминесцентных систем различных организмов показали, что несмотря на одинаковый конечный результат – излучение кванта света в видимом диапазоне спектра, механизмы, лежащие в основе этого процесса, значительно различаются у представителей различных таксонов. Разнятся не только субстраты и кофакторы, вовлеченные в реакции биолюминесценции, но и катализирующие их ферменты. Поэтому термины «люцифераза» и «люциферин» – понятия скорее собирательные и функциональные, чем структурно-химические. Хотя изучение биолюминесцентных белков различных организмов имеет фундаментальное значение, основной движущей силой, определяющей интерес к исследованию биолюминесценции, является ее полезность в качестве аналитического инструмента. В наши дни не найдется области биологии, медицины и фармакологии, где биолюминесцентные методы или уже широко не применялись бы, или не были бы опробованы, показав их пригодность. Развитие фундаментальных и прикладных исследований в этих областях требует создания эффективных неинвазивных технологий визуализации молекулярных процессов i*n vivo* как в отдельной живой клетке, так и на уровне целого организма. Прежде всего, эти технологии направлены на прижизненное исследование динамических процессов в клетке и организме, позволяя изучать рост опухолей и их метастатическую активность, а также ответ опухолевых клеток на терапию, белок-белковые взаимодействия в клетке, регуляцию экспрессии генов и многое другое.

Определение пространственных структур биолюминесцентных белков является важным и необходимым шагом для понимания механизма реакции, выявления функциональной роли аминокислотных остатков как в каталитическом окислении субстрата, так и в формировании эмиттера, а также для инженерии белков с целью конструирования репортерных молекул с улучшенными свойствами. В данной работе обсуждаются последние достижения в структурных исследованиях и белковой инженерии биолюминесцентных белков, использующих целентеразин как субстрат реакции. Среди нескольких люциферинов, идентифицированных в морских светящихся организмах, целентеразин используется биолюминесцентными белками, ответственными за свечение таксономически далеких друг от друга организмов. При этом белки не обнаруживают никакого сходства между собой ни по аминокислотным последовательностям, ни по пространственным структурам.

Исследование было поддержано грантами РФФИ № 19-54-53004 и № 17-04-00764.

Мультимеризация ДНК под действием ДНК полимеразы Bst exo- и способы ее устранения

Гарафутдинов Р.Р.[1], Гильванов А.Р.[1], Фазлетдинова З.Н.[1], Сахабутдинова А.Р.[1], Купрюшкин М.С.[2], Пышный Д.В.[2]

[1] *Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия*
[2] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Амплификация нуклеиновых кислот стала рутинным методом, используемым как в фундаментальных научных исследованиях, так и в практических областях (медицине, криминалистике и пр.). На сегодняшний день предложено огромное количество различных методов амплификации ДНК и РНК. В последнее время все больший интерес вызывают методы изотермической амплификации, особенностью которых является использование ДНК полимераз с цепь-вытесняющей активностью. Одной из самых популярных является ДНК полимераза Bst exo- (большой фрагмент ДНК полимеразы I из *Geobacillus stearothermophilus*). Несмотря на ряд присущих ей преимуществ, она обладает существенным недостатком – способностью давать мультимерные продукты на линейных ДНК-матрицах, что характерно для реакции амплификации катящимся кольцом [1].

Нами было показано, что мультимерные продукты представляют собой тандемно расположенные последовательности исходной ДНК-матрицы с редукцией ее концевых фрагментов; размер делеций варьирует в зависимости от различных факторов. Наибольшая эффективность мультимеризации наблюдалась для полимеразы Bst 2.0, при 55-60°C, при проведении реакции в объеме 15-20 мкл. Оптимальная для протекания мультимеризации длина ДНК мишени составляет 51 нуклеотид. Оказалось, что SYBR Green I в концентрации свыше 0,25× ингибирует мультимеризацию.

С помощью молекулярного докинга в три- и тетрануклеотидном приближении, а также экспериментально на мишенях с разной нуклеотидной последовательностью была изучена предпочтительность связывания полимеразы Bst exo- с ДНК. Для комплексов, состоящих из закрытой формы Bst полимеразы и двуцепочечных тринуклеотидов с метилфосфатными группами по 5'- и 3'-концам дуплекса, выявлена предпочтительность связывания активного центра фермента с АТ-богатыми нуклеотидными последовательностями.

Была изучена возможность предотвращения мультимеризации с помощью праймеров, содержащих фосфорилгуанидиновую группу (Tmg). Оказалось, что одна Tmg не сказывается на эффективности полимеризации, а полное ингибирование элонгации происходит при наличии трех и более расположенных подряд модификаций. Мультимеризация предотвращается при наличии трех и более модификаций по центру праймеров, а специфическая амплификация при этом не ингибируется.

Полученные данные могут позволить оптимизировать условия проведения изотермической амплификации с Bst полимеразой с целью повышения специфичности реакции.

1. *Wang G., Ding X., Hu J., Sun J., Mu., Y. Unusual isothermal multimerization and amplification by the strand-displacing DNA polymerases with reverse transcription activities // Sci. Rep. - 2017 - V. 7. - 13928.*

Оценка эффективности праймирования дендритных клеток для комбинированной терапии опухолевых заболеваний с использованием геномодифицированного вируса осповакцины

Гончарова Е.П., Марков О.В., Зенкова М.А.

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

Среди новых иммунотерапевтических подходов для терапии опухолевых заболеваний особое место занимают противоопухолевые вакцины на основе дендритных клеток (ДК). ДК являются антиген-презентирующими клетками, одной из главных функций которых является активация противоопухолевых CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов, способных уничтожить опухолевые клетки. Однако клиническая эффективность противоопухолевых ДК-вакцин оказалась недостаточно высокой. Комплексный иммунотерапевтический подход, основанный на сочетанном действии ДК-вакцин и онколитических вирусов (ОВ), может привести к значительному увеличению эффективности иммунотерапии опухолей за счет синергического действия ДК и ОВ. Праймирование ДК дополнительными вирусными антигенами, помимо опухолеспецифических антигенов, увеличит спектр поликлональности противоопухолевого Т-клеточного иммунного ответа, запускаемого такими ДК.

С целью определения оптимальной нагрузки ДК вирусными антигенами для наиболее эффективного праймирования ДК при сохранении их функциональной активности изучена динамика накопления вируса осповакцины штамм LIVP-GFP в ДК и культуре перевиваемых клеток ДК (DC2.4). Оценка эффективности экспрессии вирусных антигенов в ДК и в клетках DC2.4 методом проточной цитометрии на различные сроки после заражения показала, что максимальная экспрессия вирусных белков наблюдалась при множественности заражения (MOI) 10 БОЕ на клетку через 48 ч после инфицирования. Однако, учитывая то, что цитопатическое действие вируса на ДК при использовании дозы вируса 10 БОЕ было максимальным, для праймирования ДК была выбрана доза вируса 1 MOI. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что инактивированный вирус осповакцины также может быть использован для эффективного праймирования ДК.

Таким образом, на основании проведенных исследований выбраны режимы оптимального праймирования ДК вирусными антигенами для комбинированной терапии опухолевых заболеваний с использованием геномодифицированного вируса осповакцины.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ грант № 18-34-20109 и бюджета РФ бюджетный проект ИХБФМ СО РАН № АААА-А17-117020210024-8.

CARология сегодня

Горчаков А.А.[1,2], Кулемзин С.В.[1], Чикаев А.Н.[1], Беловежец Т.Н.[1,2], Матвиенко Д.А.[1,2], Волкова О.Ю.[1], Чикаев Н.А.[1], Субракова В.Г.[1,2], Таранин А.В.[1,2]

1 Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия
2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Высокая эффективность CAR Т-клеточной терапии в отношении ряда онкогематологических заболеваний подтверждается результатами клинических испытаний, более того, FDA уже одобрило два препарата для лечения острого В-лимфобластного лейкоза и диффузной В-крупноклеточной лимфомы. Тем не менее успехи в терапии солидных типов рака значительно скромнее. Основными направлениями, в которых ведется разработка новых средств CAR Т-клеточной терапии являются: преодоление гетерогенности солидных опухолей за счет использования полиспецифичных CAR; повышение устойчивости CAR-эффекторов к супрессивному опухолевому микроокружению при помощи геномного редактирования, а также снижение стоимости производства CAR-продуктов.

Нами ведутся работы во всех перечисленных направлениях усовершенствования CAR платформы. В частности, получены CAR на основе альтернативных антиген-распознающих структур, изучено влияние различных шарнирных районов CAR на цитотоксическую активность Т- и NK- клеток, получены NK-клеточные линии повышенной цитотоксичности, совершенствуется ECAR NK-платформа.

Исследования были поддержаны грантами РФФИ 17-04-02044 и 18-29-01022.

Первичные культуры опухолей головного мозга человека как модель для опухоль-адресующей терапии глиом

Дмитриева М.Д.[1,2], Войтова А.А.[2], Нуштаева А.А.[2], Коваль О.А.[1,2], Дымова М.А.[2], Кулигина Е.В.[2]

1 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия
2 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Одним из самых трудноизлечимых типов злокачественных новообразований являются опухоли головного мозга, 81% которых составляют глиомы. Стандартные методы лечения глиом обладают ограниченной эффективностью, увеличивающей продолжительность жизни пациентов в среднем на один год. Низкая эффективность применяемой терапии обусловлена, в основном, неспецифичностью применяемых методов лечения. Одним из возможных путей решения данной проблемы является таргетная терапия, основанная на применении препаратов, специфически воздействующих на конкретные типы опухолей, что позволяет повысить эффективность лечения и минимизировать токсические эффекты в отношении здоровых тканей организма. Использование в качестве моделей опухолей первичных культур клеток глиом человека, которые максимально воспроизводят молекулярный профиль клеток исходной опухоли, способствует развитию данного терапевтического подхода.

В ходе настоящей работы из биоптатов опухолей получены шесть первичных культур клеток: культуры анапластической олигодендроглиомы и анапластической астроцитомы, и четыре культуры клеток глиобластомы человека. Проведено сравнение морфологии и характера роста клеток первичных культур и клеток иммортализованных культур глиом человека T98G, U87 MG, U251 и U343. Показано, что клетки первичных и иммортализованных культур значительно отличаются по размеру, морфологии и скорости роста. Для характеризации клеток полученных первичных и иммортализованных культур использовали следующие опухолевые маркеры: глиальный кислый фибриллярный белок (GFAP), Ki-67, рецепторы CD44 и CD133. Методом иммуноцитохимии показано, что уровень GFAP достаточно высок в клетках всех исследованных культур. Показано, что наибольший уровень Ki-67 наблюдался в клетках иммортализованных культур, обладающих эпителиальным фенотипом, в то время как в фибробластоподобных клетках первичных культур этот маркер детектировался на низком уровне. Уровень маркеров CD44 и CD133 определяли методом проточной цитометрии. В клетках практически всех культур количество CD44-положительных клеток находилось на высоком уровне, наибольшее количество было обнаружено в культуре T98G и составило 96,9%. Количество CD133-положительных клеток детектировалось на крайне низком уровне во всех исследуемых культурах. Уровень мРНК опухолевых маркеров EGFR, CD44, p53 и Ki-67 определяли методом ОТ-ПЦР. Чувствительность клеточных культур к онколитическому действию вируса осповакцины VV-GMCSV-Lact оценивали с помощью МТТ-теста. Наибольшую чувствительность к онколитическому действию вируса проявили клетки культуры AS2 (анапластическая астроцитома).

Работа выполняется при финансовой поддержке РНФ (проект № 19-44-02006).

Сборка многоуровневых наноконструкций для доставки олигонуклеотидов в клетки

Довыденко И.С., Епанчинцева А.В., Полетаева Ю.Е., Пышная И.А., Рябчикова Е.И.

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

Ключевой проблемой создания препаратов на основе нуклеиновых кислот (НК) является доставка активного олигонуклеотида к месту его действия в клетке: цитозоль, митохондрии или ядро. Крайне низкая стабильность нативных НК в присутствии нуклеаз, их большой размер и высокий отрицательный заряд, не позволяют им самостоятельно проникать в клетки-мишени. Для повышения эффективности доставки синтетических НК на сегодняшний день предложено множество способов и носителей [1–3]. Одним из перспективных подходов является доставка с помощью липидных наночастиц. Конструкции на основе липидов широко используются в разработках средств доставки терапевтических агентов, в том числе НК [4]. Достоинствами данного метода доставки являются возможность использования природных липидных соединений, способных к расщеплению в клетке, высокая биосовместимость, отсутствие иммуногенности, возможность модификации липидной конструкции адресующими лигандами [5]. Ряд препаратов на основе НК, инкапсулированных в липидные частицы, проходит клинические испытания [6].

Целью данной работы является создание многоуровневого нанокомплекса-транспортера НК, в основе которого лежит жесткое ядро, несущее НК, и помещенное во внутреннее пространство липосомы. Внешняя оболочка частицы призвана обеспечить сохранность НК в присутствии нуклеаз, а также выход НК из эндосом. Сборка частиц основана на гидрофобном и электростатическом взаимодействии отдельных компонентов частицы, для чего были использованы новые pH-зависимые катионные липиды. Изучено проникновение нанокомплекса в клетку и реализация функций транспортируемой НК.

1. *Boisguérin P., Deshayes S., Gait M.J., O'Donovan L., Godfrey C., Betts C.A., Lebleu B. Delivery of therapeutic oligonucleotides with cell penetrating peptides. // Adv. Drug Deliv. Rev. - 2015. - V. 87. - P 52–67.*
2. *Wang Y., Miao L., Satterlee A., Huang L. Delivery of Oligonucleotides with Lipid Nanoparticles. // Adv. Drug Deliv. Rev. - 2015. - V. 87. - P 68-80.*
3. *Dizaj S.M., Jafari S. Khosroushahi A.Y. A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors. // Nanoscale Res. Lett. - 2014. – V. 9. - P 1–9.*
4. *Torchilin V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. // Nat. Rev. Drug Discov. – 2005. – V. 4. - P 145–160.*
5. *Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S.W., Zarghami N., Hanifehpour Y., Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. // Nanoscale Res. Lett. - 2013. – V. 8. – P 102.*
6. *Ashizawa A.T., Cortes J. Liposomal delivery of nucleic acid-based anticancer therapeutics: BP-100-1.01. // Expert Opin. Drug Deliv. - 2015. – V. 12. - P 1107-1120.*

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 19-15-00217.

Персонализированная антиагрегантная терапия при ОКС у пациентов различных этнических групп

Зеленская Е.М.[1], Воронина Е.Н.[1], Николаев К.Ю.[1], Донирова О.С.[2], Алтаев В.Д.[2], Лифшиц Г.И.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Республиканская клиническая больница им. Н.А.Семашко, Улан-Уде, Россия*

Введение. Пациенты, перенесшие стентирование коронарных сосудов (СКС) по поводу острого коронарного синдрома (ОКС), имеют более высокий риск тромбоза стента при наличии аллелей CYP2C19 (*2 и *3), чем пациенты, с обычным генотипом. У носителей аллеля CYP2C19*17 чаще встречаются кровотечения на фоне приема клопидогрела [1]. У европеоидов этот аллель встречается с частотой 17-27%, среди азиатов – с частотой 0,4-4% [2]. Это имеет значение для гетерогенной популяции Сибири, тк ее население представлено как теми, так и другими. VEGFR-2 - ген рецептора 2 типа к фактору роста эндотелия. Наличие генотипа TT (rs2305948) ассоциировано с увеличением тромботических осложенеий [3].

Материалы и методы. В исследование включены 123 русских (жителей Иркутска) и 113 бурят (жители Улан-Удэ), поступивших по экстренным показаниям для СКС по поводу ОКС. Пациенты стратифицированы по носительству аллелей CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17 и VEGFR-2 rs2305948. Были определены исходы в течение 30 дней.

Результаты. Частота аллеля CYP2C19*2 составила среди бурят 12,9%, среди русских 10%, различия не достоверны (OR=1.344, CI [0.774-2.334]). Частота аллеля CYP2C19*3 оказалась достоверно выше среди бурят (12,9%), чем среди русских(1,6%).(OR=8.250, CI [3.202-26.334]) Частота CYP2C19*17 среди бурят достоверно ниже, чем среди русских (9,1%, и 24,4%) (OR=2,652, CI [1.934- 5.434]). Частота минорного аллеляVEGFR-2 rs2305948 составила среди бурят 13,0%, среди русских 11,0%, достоверных различий не было выявлено. (OR=1,038, CI [0.625- 1.970]). На смешанной выборке показано, что у носителей аллеля CYP2C19*3 чаще встречаются ангинозные боли после СКС, не потребовавшие госпитализации (OR=4,190, CI [1,115-15,263]). Наличие VEGFR-2 rs2305948 не показало достоверной ассоциации с наличием неблагоприятных исходов.

Заключение: На основании генетического тестирования редких аллелей CYP2C19 и VEGFR-2 можно прогнозировать более частое возникновение тромботических осложнений у бурят на фоне приема клопидогрела после СКС, чем у русских.

1. *Mega JL et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. JAMA 2010; 304(1):1821-1830.*
2. *Santos PCJL et al. CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms areum differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. BMC Medical Genetics 2011, 12:13.http://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/13*
3. *Zhang L. et al. Association of VEGFR-2 Gene Polymorphisms With Clopidogrel Resistance in Patients With Coronary Heart Disease. // Am. J. Ther. – 2016. – Vol. 23(6). – P. 1663-1670.*

Ассоциации генетических факторов с тяжестью постинфарктного ремоделирования миокарда

Печерина Т.Б.[1], Кашталап В.В.[1], Гончарова И.А.[2], Пузырев В.П.[2], Барбараш О.Л.[1]

[1] *ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия*
[2] *НИИ медицинской генетики ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр российской академии наук», Томск, Россия*

Развитие инфаркта миокарда (ИМ) ухудшает прогноз пациентов с ИБС за счет ранних осложнений и последующего фиброзирования миокарда (постинфарктный кардиосклероз), тяжесть которого также может иметь генетическую детерминанту. В настоящее время активно изучаются генетические факторы формирования и развития процессов фиброзирования миокарда, а также их связь с прогнозом у больных ИБС. Вместе с тем результаты этих исследований остаются неоднозначными.

Цель исследования: выявление ассоциаций ряда полиморфных вариантов генов фиброгенеза с наличием у пациентов постинфарктного кардиосклероза.

Материал и методы: в исследование последовательно включены 404 пациентов с верифицированной хронической ИБС, которые были госпитализированы в кардиологическое отделение для подготовки к проведению КШ. Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practive) и принципами Хельсинской Декларации. С помощью программного обеспечения Genotyping Assay Design из отобранных было выбрано 58 SNP и создано две мультиплексные панели 27SNP («27-плекс») и 31SNP («31-плекс»). После оценки информативности созданных панелей генетических маркеров для русского населения г. Томска [Гончарова, 2015], для дальнейшего анализа были использованы 48 однонуклеотидных варинтов (SNP). Группа контроля была представлена популяционной выборкой жителей Сибири (285 человек).

Результаты: средний возраст пациентов в общей группе больных составил 60,1 (55; 65) лет. Из 404 больных – 324 мужчин (80,2%) и 80 женщин (19,8%). Превалирующими анамнестическими факторами сердечно-сосудистого риска явились: АГ – у 361 (89,4%) пациентов, курение у 256 (63,4%) больных, СД 2-го типа встречался у 78 (19,3%) больных. Признаки хронической сердечной недостаточности были диагностированы у 377 пациентов (93,3%). В зависимости от наличия постинфарктного кардиосклероза группа больных с ИБС была разделена на две подгруппы: – подгруппа с ПИКС [188 человек, 159 мужчин и 29 женщин, среднего возраста 59 (54; 64) лет]; – подгруппа без ПИКС [216 человек, 157 мужчины, 59 женщины, среднего возраста 61 (56; 67) лет]. При сравнении частот генов между исследуемыми группами больных с ПИКС и без ПИКС, были обнаружены различия по SNP генов toll-подобного рецептора 4 – TLR 4 (rs4986790), инсулиноподобного фактора роста, связывающего белок типа 7 – IGFBP 7 (rs11133482), рецептора липропротеидов низкой плотности – LDLR (rs2738446) и OAS1 (rs1131454). Было показано, что больные имеющие в анамнезе инфаркт миокарда, характеризуются более высокими частотами: – аллеля G и генотипов, несущих аллель G (GG и AG) гена TLR 4 (rs4986790); генотипа GG гена IGFBP 7 (rs11133482); аллеля G и генотипов GG и CG гена LDLR (rs2738446) и генотипа GG гена и OAS1 (rs1131454).

Выводы. Риск развития ИМ и ПИКС выше у пациентов с ИБС-носителей генотипов: – GG и GA гена TLR4 (rs4986790) в 2 раза; – GG гена IGFBP7 (rs11133482) в 2,4 раза; GG и CG LDLR (rs2738446) в 1,9 раза; AA и GA гена OAS1 (rs1131454) в 2 раза. Протективными относительно ИМ и ПИКС при ИБС являются генотипы: – AA гена TLR4 (rs4986790); – AA и AG гена IGFBP7 (rs11133482); CC гена LDLR (rs2738446); GG гена OAS1 (rs1131454).

Источник финансирования: в рамках фундаментальной темы института.

Виртуальный пациент: разработка технологии на примере модульной математической модели сердечно-сосудистой системы человека и предсказание эффективности лечения артериальной гипертензии

Колпаков Ф.А.[1,2], Киселев И.Н.[1,2], Кутумова Е.О.[1,2], Колпакова А.Ф.[2], Лифшиц Г.И.[3]

1 Институт вычислительных технологий СО РАН, Новосибирск, Россия
2 ООО «БИОСОФТ.РУ», Новосибирск, Россия
3 3Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Нами разработана технология построения виртуального пациента и оптимизации выбора лекарственной терапии на примере лечения артериальной гипертонии. Для достижения этой цели нами было решено 3 основные задачи:

1) построение модульной математической модели биохимии и физиологии человека с достаточным уровнем детализации для заданной болезни. Мы полагаем, что сейчас не реально построить «виртуального пациента» на все случаи жизни. Поэтому наш подход – создать набор основных блоков, а из них собирать модель под заданного пациента и болезнь (как из блоков конструктора Лего).

2) для основных классов антигипертензивных препаратов: прямых ингибиторов ренина (алискирен), блокаторов кальциевых каналов (амлодипин), антагонистов рецепторов ангиотензина II (лозартан, азилсартан), ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (эналаприл, периндоприл, лизиноприл), бета-адреноблокторов (бисопролол, метопролол) и тиазидоподобных диуретиков были определены их точки воздействия на построенную модель сердечно-сосудистой системы человека и были построены соответствующие модели фармакокинетики и фармакодинамики. Для валидации полученной модели мы использовали данные клинических исследований, найденные в литературе.

3) персонализация модели - задание параметров модели для заданного пациента, для этого мы использовали данные клинических исследований. Однако из этих данных можно оценить только меньшую часть параметров модели. Чтобы решить проблему с неизвестными персональными параметрами строилось множество виртуальных пациентов, при этом известные параметры у этих моделей соответствуют данным заданного пациента, а неизвестные - могут существенно варьировать.

С помощью предложенного подхода было проведено моделирование лечения артериальной гипертонии для 6 реальных пациентов. Предложенный алгоритм выдал достаточно точный прогноз лечения выбранным антигипертензивным препаратом для конкретного пациента.

Как практический результат работы, была разработана компьютерная программа. Программа работает следующим образом: в нее вводятся имеющиеся данные пациента, после этого программа создает множество виртуальных пациентов, для которых она предсказывает наиболее вероятный эффект их лечения разными лекарствами и какие неизвестные персональные параметры нужно определить, чтобы сделать более точный выбор. Однако для внедрения этой программы в медицинскую практику нужно пройти еще большой путь - апробировать ее на большом количестве пациентов и пройти процесс сертификации.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 16-01-00779.

Спектр рекомбинантных штаммов вируса осповакцины для лечения онкозаболеваний

Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф.

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия

Вирус осповакцины (vaccinia virus, VACV) имеет блестящую историю медицинского применения в качестве противооспенной вакцины и обладает природной онкоселективностью. Однако VACV способен реплицироваться и в нормальных клетках человека, вызывая в ряде случаев поствакцинальные осложнения. В связи с этим для виротерапии онкозаболеваний, требующей многократных введений вируса, разрабатываются рекомбинантные аттенуированные штаммы VACV со встройкой терапевтически значимых трансгенов.

Для аттенуации и повышения онкоселективности VACV наиболее часто используют делецию гена вирусной тимидинкиназы (ТК), который несущественен для репликации вируса в быстроделящихся раковых клетках. Вторым по значимости для онкотерапии фактором вирулентности VACV является ген вирусного ростового фактора (VGF). Районы делеций генов вирулентности вируса используются для встройки трансгенов, среди которых: цитокины (ГМ-КСФ, ИЛ-2, ИЛ-15, ФНО-α); хемокины (CCL5; CXCL11, CCL19); чек-пойнт ингибиторы (анти-PD1, анти-CTLA4; PD1-R); супрессоры/стимуляторы иммунитета (CD80, CD86, CD44), онкотоксины (апоптин, лактаптин, TRAIL); BiTE и другие [1].

Первым рекомбинантным штаммом VACV, разрешенным для проведения клинических испытаний, является Pexa-Vec (Jennerex Inc., США) с делецией ТК гена и встройкой трансгена ГМ-КСФ. В настоящее время этот штамм проходит III стадию клинических испытаний в отношении гепатоцеллюлярной карциномы. Механизм действия Pexa-Vec включает селективную инфекцию и лизис опухолевых клеток, индукцию противоопухолевого иммунного ответа и деструкцию сосудов опухоли. Pexa-Vec продемонстрировал безопасность даже при внутривенном введении больших доз вируса, а также значимое увеличение времени жизни пациентов. Фазу I клинических испытаний успешно прошли ещё два рекомбинантных штамма VACV: GL-ONC1 (Genelux, США-Германия) и vvDD-CDSR (University Pittsburgh, США). В России закончены доклинические исследования рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact (делеции ТК и VGF генов, встройка трансгенов ГМ-КСФ и лактаптина) [2].

Несмотря на обнадеживающие результаты монотерапии рекобинантными штаммами VACV, наибольший успех был достигнут при комбинировании виротерапии с химио-, радио-, иммуно- и клеточной терапией [1]. Во всех комбинациях рекомбинантные штаммы VACV оказывали синергичный противоопухолевый эффект.

1. *Torres-Domínguez L., McFadden G. Poxvirus Oncolytic virotherapy // Expert Opinion on Biological Therapy. – 2019. - DOI: 10.1080/14712598.2019.1600669*
2. *Kochneva G., Sivolobova G., Tkacheva A., Grazhdantseva A., Troitskaya O., др. всего 10 человек. Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy // Oncotarget. – 2016. – V. 7. - P 74171-74188.*

Исследование было поддержано грантом РФФИ №18-29-09044\18.

Нанопроволочные биосенсоры для индикации органоспецифичных РНК

Наумова О.В.[1], Фомин Б.И.[1], Дмитриенко Е.В.[2], Пышная И.А.[2], Пышный Д.В.[2]

[1] *Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

Нанопроволочные сенсоры являются универсальной платформой для высокочувствительной детекции биологических и химических веществ. Одним из интенсивно развивающихся направлений развития и использования биосенсоров является создание на их основе электронных детекторов белковых и микро-РНК маркеров социально-значимых заболеваний, например, рака легких [1], рака груди [2], инфаркта миокарда, и др. Особое внимание уделяется созданию многоканальных сенсоров на основе пленок кремния-на-изоляторе (КНИ). Многоканальность сенсорных элементов обеспечивает увеличение эффективной площади, соответственно, вероятности и верификации индикации аналита. Использование КНИ обусловливает возможность массового производства детекторов в рамках промышленной кремниевой технологии.

Принцип действия прибора основан на модуляции проводимости нанопроволочного сенсорного элемента при адсорбции на его поверхность частиц аналита практически любой природы. Биосенсором такой прибор становится после формирования на его поверхности специального слоя, способного с высокой селективностью и специфичностью распознавать частицы аналита в тестируемом растворе. Поэтому модификация и контроль состояния поверхности сенсоров являются одними из ключевых проблем и задач при изготовлении таких приборов.

Целью работы является исследование специфичной детекции органоспецифических биоорганических объектов малых концентраций матричных органоспецифичных РНК с помощью многоканальных сенсоров с разными типами модификации поверхности. Особое внимание уделено методам модификации и контроля состояния поверхности сенсоров.

1. *Dmitrienko E., Naumova O., Fomin B., Kupryushkin M., Volkova A., др. всего 9 человек. Surface modification of SOI-FET sensors for label-free and specific detection of short RNA analyte // Nanomedicine. – 2016. - V. 11. - P 2073-2082.*
2. *Ivanov Yu. D., Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kozlov A.F., Kaysheva A.L., др. всего 17 человек. Detection of marker miRNAs in plasma using SOI-NW biosensor // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2018. - V. 261. - P 566-571.*
3. *O.V. Naumova, B.I. Fomin. Interface-State Density in SOI-FET Sensors // WSEAS Transaction on System and Control. - 2018. - V.13. – P 514-519.*

Исследования выполнены при поддержке ГЗ №0306-2018-0004.

Онколитические вирусы: состояние разработок за рубежом

Нетёсов С.В.

Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

В начале 20 века несколькими внимательными врачами были отмечены случаи исчезновения опухолей после заболеваний некоторыми инфекционными заболеваниями или процедур вакцинации. Однако, ввиду трудно предсказуемой эффективности такого метода лечения и невыясненных механизмов образования и развития опухолей этот подход в течение 20-века так и не вошел в широкую практику. В связи с открытием ряда механизмов инициации и развития онкозаболеваний, а также развитием технологий получения рекомбинантных вирусов в начале 21 века этот подход начал поступательно развиваться. И уже к 2007 году в Китае к массовому применению для лечения рака были разрешены два рекомбинантных штамма аденовируса. Параллельно в США в течение последних 15 лет были проведены более 100 клинических испытаний различных онколитических вирусов, а в конце 2015 года там же впервые в истории было разрешено широкое клиническое использование рекомбинантного аттенуированного штамма герпес-вируса для лечения меланомы. В том же месяце были разрешены и широкие клинические испытания 4 фазы сразу в 12 странах и более чем в 100 больницах одного из рекомбинантных онколитических штаммов вируса осповакцины. В последние три года также начаты 1-2 фазы клинических испытаний рекомбинантных онколитических штаммов парамиксовирусов, реовирусов, аденовирусов, вируса миксомы и энтеровирусов.

Применяемые в настоящее время онколитические вирусы можно разделить на три категории: дикие, природные вирусы, которые обычно не инфицируют нормальные клетки, но являются цитотоксичными для дефектных опухолевых клеток; аттенуированные или вакцинные штаммы вирусов, специфически нацеленные на раковые клетки; вирусы со значительным по размеру геномом, в который встроены гены цитотоксических или усиливающих противоопухолевый иммунитет белков. Последние версии рекомбинантных онколитических вирусов объединяют все эти категории.

Отметим, что большое природное видовое разнообразие некоторых вирусных семейств, причем слабо-или не-патогенных для человека, наталкивает на мысль о том, что периодические заболевания этими типами вирусов могут играть положительную роль в «очистке» организма человека от раковых клеток. И в этом смысле стоит присмотреться к истории возникновения такого многообразия вирусных патогенов и возможном участии геномов человека в возникновении таких вирусов и их многообразии ввиду полезности существования таких симбиозов для защиты от онкозаболеваний.

К настоящему времени направление терапии рака онколитическими вирусами сформировалось и активно развивается в США, Корее, Китае, Финляндии. В ряде этих стран развернулось его широкое применение с одобрением на уровне государственных органов здравоохранения, и оно имеет все возможности для развития и в России.

О международной инициативе по предотвращению незаконного синтеза патогенных или токсинных ДНК

Нетёсов С.В.

Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Химически синтезированная ДНК сейчас является основой исследований как в области биологических наук, так и для развития биотехнологий. Доступность таких ДНК имеет решающее значение для технического и экономического прогресса. Однако с расширением доступа и снижением стоимости синтеза ДНК растет и вероятность того, что злонамеренные субъекты будут злоупотреблять этими технологиями для создания опасных патогенов или токсинов. Для предотвращения такой вероятности некоторые правительства и большие биотехнологические компании начали проводить проверку заказов на синтез ДНК на предмет потенциального незаконного использования. В 2010 году в США были введены основные принципы проверки заказов на синтез ДНК. Кроме того, члены Международного консорциума по синтезу генов (IGSC - https://genesynthesisconsortium.org/), созданного в 2009 году, разработали Гармонизированный протокол проверки, который представляет собой рекомендации по предотвращению создания опасных патогенов или токсинов злонамеренными субъектами. Данные рекомендации пока что остаются добровольными для всех поставщиков ДНК и не соблюдаются повсеместно, поскольку IGSC представляет лишь около 80% мирового рынка производителей ДНК.

Цель предполагаемого нового международного механизма контроля состоит в том, чтобы затруднить злонамеренным субъектам (или тем, у кого благие, но непродуманные намерения), получить синтетическую ДНК, которую можно было бы использовать для создания опасного патогена или токсина. Этот механизм должен быть спроектирован так, чтобы быть экономически эффективным и устойчивым в постоянно меняющейся технологической и коммерческой среде. Такой подход должен облегчить доступ к синтетической ДНК для ее использования только в мирных целях, уменьшая при этом риск преднамеренного или случайного неправильного использования.

Ключевыми компонентами разрабатываемого механизма предотвращения незаконного синтеза ДНК предполагаются:

- Поставщики синтезированных ДНК будут удостоверять, что они:
  - Будут использовать общую базу данных для скрининга заказываемых ДНК на наличие патогенных или токсиновых ДНК.
  - Будут поставлять патоген-специфичную или токсин-специфичную ДНК только легитимным и ответственным исследователям/организациям.
- Те, кто производит и продает синтезаторы ДНК, будут их продавать только организациям, подписавшим обязательство о проверке заказываемых генов на предмет их непринадлежности генам токсинов или патогенов.

Чтобы добиться широкого признания этого механизма, компаниям и частным лицам, которые синтезируют ДНК, должна быть доступна международная унифицированная база данных ДНК патогенов или токсинов. Компании, входящие в IGSC, разработали первый вариант такой базы данных. Его доработка и согласование будут иметь решающее значение для предотвращения незаконного синтеза опасных молекул ДНК. Опыт скрининга последовательностей ДНК показал, что неоднозначности в базе данных требуют времени и опыта для устранения ошибок. В экспертно курируемой базе данных их устранить возможно. Кроме того, необходима будет и разработка или адаптация существующего программного обеспечения для работы с такой базой данных, а также будет необходимо отработать международные механизмы координации действий в этой области знаний.

Адресная доставка систем на основе магнитных наночастиц в опухоль: роль патофизиологических особенностей опухоли

Першина А.Г.[1,2], Брикунова О.Я.[1,2], Демин А.М.[3], Абакумов М.А.[4], Ванеев А.Н.[5], Науменко В.А.[4], Низамов Т.Р.[4], Шевелев О.Б.[6], Разумов И.А.[6], Завьялов Е.Л.[6], Вторушин С.В.[1,7], Краснов В.П.[3], Мажуга А.Г.[4,5,8]

[1] *Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия*
[2] *Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия*
[3] *Институт органического синтеза имени П.Я. Постовского, Екатеринбург, Россия*
[4] *Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия*
[5] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
[6] *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*
[7] *Научно исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия*
[8] *Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Москва, Россия*

Магнитные наночастицы являются привлекательно платформой для доставки терапевтических молекул – наличие магнитных свойств позволяет предлагать изящные решения для управляемого высвобождения молекул, усиления их аккумулирования в опухоли, контроля эффективности накопления методом МРТ. Однако проблема селективного накопления наносистем в опухоли до сих пор остается нерешенной. Многообещающей альтернативой использованию векторных молекул с высокой аффинностью к рецепторам, экспрессированным на поверхности клеток в опухоли, является адресная доставка с pH-чувствительными молекулами. Данная стратегия доставки основана на характерном для многих солидных опухолей пониженном значении межклеточной pH и позволяет избежать ограничения, связанные с высокой гетерогенностью раковых клеток [1].

Нами была исследована доставка ряда наносистем на основе магнитных наночастиц оксида железа и наночастиц, модифицированных pH-чувствительным встраивающимся пептидом (pHLIP), на моделях опухолевого роста у экспериментальных животных. Было показано, что конъюгация наночастиц pHLIP позволяет наночастицам дольше удерживаться в опухоли. Однако эффективность накопления наносистем в опухоли варьировала внутри одной экспериментальной группы животных и зависила от значения pH в опухоли. В целом, сайты накопления наночастиц в опухоли преимущественно были локализованы в областях с высокой плотностью кровеносных сосудов. Таким образом, патофизиологические особенности опухоли играют определяющую роль в эффективности адресной доставки наносистем.

1. *Wyatt L.C., Lewis J.S., Andreev O.A., Reshetnyak Y.K., Engelman D.M. Applications of pHLIP Technology for Cancer Imaging and Therapy //Trends Biotechnol. – 2017. –V. 35. – P. 653-664.*

Исследование было поддержано грантами РФФИ № 184-015-00319, РНФ 17-14-01316.

Терапевтический потенциал биомедицинского клеточного продукта при ишемии нижних конечностей

Повещенко О.В.[1,2], Лыков А.П.[1,2], Нимаев В.В.[1], Суровцева М.А.[1,2], Казаков О.В.[1], Бондаренко Н.А.[1,2], Янкайте Е.В.[1],Ким И.И.[1,2]

[1] *Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Национальный исследовательский медицинский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина МЗ РФ, Новосибирск, Россия*

Разработка клеточных технологий рассматривается в качестве одного из актуальных инновационных подходов к лечению ряда заболеваний, а стволовые/прогениторные клетки, в силу своей способности к самоподдержанию и дифференцировке в специализированные клетки, могут с успехом применяться для восстановления и/или замещения клеток, утраченных организмом. В то же время стволовые/прогениторные клетки могут быть источником различных регуляторных биологически активных молекул – цитокинов и факторов роста, тем самым, опосредуя паракринные эффекты [1].

Исследовано влияние внутримышечного введения мононуклеарных клеток периферической крови, обогащенных мобилизованными клетками костного мозга и костномозговых мезенхимальных стволовых клеток, суммарных продуктов их секреции, эритропоэтина на параметры микроциркуляции в ишимезированной конечности в доклинических моделях in vivo [2]. Показана стимуляция функциональных свойств эндотелиальных клеток EA.Hy926 in vitro различными цитокинами и ростовыми факторами. Проводимые клинические исследования показали снижение смертности и ампутаций конечностей, увеличение дистанции безболевой ходьбы и максимальной дистанции ходьбы после применения аутологичных мононуклеарных клеток у пациентов с ХИНК IIБ-III стадии при облитерирующем атеросклерозе в отдаленном периоде.

1. *Liew A., O'Brien T. Therapeutic potential for mesenchymal stem cell transplantation in critical limb ischemia // Stem Cell Res. Ther. - 2012. - Vol. 3, - N 4. - P. 28. doi: 10.1186/scrt119.*
2. *Lykov A.P., Bondarenko N.A., Poveshchenko O.V., Kabakov A.V., Surovtseva M.A., Kim I.I., Kazakov O.V., Poveshchenko A.F. Effect of intramuscular administration of mesenchymal stem cells and erythropoietin on angiogenesis in critical limb ischemia // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. - 2018. - T. 165. - № 1. C. 121-126. DOI: 10.1007/s10517-018-4112-z.*

Поиск эпигенетических маркеров прогрессии/ингибирования предопухолевых изменений бронхиального эпителия: анализ профиля метилирования ДНК при гиперпластических и метапластических изменениях

Пономарева А.А.[1], Денисов Е.В.[1,2], Гервас П.А.[1], Панкова О.В.[1], Щеголева А.А.[1], Киселев А.М.[3], Чердынцева Н.В.[1], Перельмутер В.М.[1]

[1] *НИИ онкологии Томский НИМЦ, Томск, Россия*
[2] *ТГУ, Томск, Россия*
[3] *ОФК 10, ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

Актуальность. Плоскоклеточный рак легкого (ПРЛ) возникает в результате прогрессивно развивающихся на фоне хронического воспаления предопухолевых изменений эпителия бронхов, встречающихся изолированно или сочетано друг с другом: базальноклеточной гиперплазии (БКГ), плоскоклеточной метаплазии (ПМ) и дисплазии I-III степеней. Процесс перехода может прерваться на любой стадии, оставаться в стабильном состоянии и далее подвергаться ингибированию или прогрессировать. Причины и механизмы разных «сценариев» изменений бронхиального эпителия в условиях хронического воспаления неизвестны. В связи с этим актуальным является выявление маркеров не только специфичных для БКГ, ПМ и дисплазии I-III степени, но и однозначно прогнозирующих их прогрессию или обратное развитие.

Материалы и методы. С помощью лазерной микродиссекции (PALM, Carl Zeiss) из образцов нормальной ткани лёгкого, полученных от больных ПРЛ, были выделены фокусы БКГ (3 образца иБКГ и 3 - пмБКГ) и нормального эпителия (n=6, от тех же пациентов с БКГ). Для приготовления ДНК-библиотек использовали набор Pico Methyl-Seq Library Prep Kit (Zymo Research). Полногеномное секвенирование проводили на приборе HiSeq (Illumina).

Результаты. Выявлено 5 383 297 CpG островков, перекрывающихся хотя бы одним ридом между изученными образцами: иБКГ, пмБКГ, нормальный эпителий бронхов. С помощью метода главных компонент, удалось подтвердить схожесть профилей метилирования ДНК между образцами БКГ и нормального эпителия, полученными от одних и тех же пациентов, и кроме того, найти образцы со значительными отличиями в метиломе. С использованием кластерного анализа показана близость образцов БКГ и нормального эпителия в пределах одного и того же случая. Также нам удалось идентифицировать несколько кластеров, в число которых вошли образцы с максимально близким профилем метилирования. В целом, распределение метилирования не значительно различалось между образцами, что говорит о корректности бисульфитной обработки и подготовки библиотек. Выявлено гипометилирование гена *SAPCD2*, вовлеченного в регуляцию деления опухолевых клеток, и гиперметилирование гена-онкосупрессора *ST14* в БКГ по сравнению с нормальным эпителием бронхов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-29-06002, стипендии Президента РФ (№ СП-1549.2018.4, 2018-2020 гг.).

Вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact – препарат для терапии солидных опухолей

Рихтер В.А.[1], Коваль О.А.[1], Кочнева Г.В.[2], Кулигина Е.В.[1]

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия
2 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, пос. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Сконструирован рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, продуцирующий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека и онкотоксический белок лактаптин.

VV-GMCSF-Lact эффективно ингибирует рост опухолевых клеток человека различного гистогенеза *in vitro.* В экспериментах *in vivo* на опухолях молочной железы человека MDA-MB-231 и глиобластомы человека U87-MG, трансплантированных иммунодефицитным мышам, индекс торможения роста опухоли превышал 80%. После инратуморального введения вирус интенсивно размножается в опухоли, разносится кровотоком по организму и поражает опухолевые клетки, находящиеся в других органах и тканях организма, т.е. проявляет выраженную антиметастатическую активность. Лактаптин, синтезирующийся внутри инфицированной клетки, индуцирует апоптоз клеток опухоли по установленному ранее механизму. ГМ-КСФ, секретируемый в межклеточное пространство, стимулирует местный противоопухолевый иммунный ответ.

Через 12 дней после внутриопухолевого введения вирус практически полностью элиминируется из здоровых органов и тканей организма. При этом концентрация вирусных частиц в опухолевых клетках остается на постоянном уровне.

Таким образом, рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины является самореплицирующимся лекарством, циркулирующим в организме и поражающим только онкотрансформированные клетки.

В настоящее время закончены доклинические исследования лекарственного препарата на основе VV-GMCSF-Lact. Полученные результаты подтверждают безопасность и противоопухолевую эффективность препарата. Препарат рекомендован для клинических испытаний.

Поиск метаболомных маркеров рассеянного склероза, оценка эффективности диагностических моделей

Касакин М.Ф.[1], Рогачев А.Д.[2,3], Предтеченская Е.В.[2,4], Заиграев В.Ю.[3,4], Коваль В.В.[1], Покровский А.Г.[2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*
[3] *Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия*
[4] *Городская клиническая больница скорой медицинской помощи №2, Новосибирск, Россия*

Рассеянный склероз (РС) – это воспалительное аутоиммунное заболевание, вызывающее диемиелинизацию аксонов нервных клеток, что в конце концов приводит к инвалидности. Существуют две основные гипотезы о механизме развития заболевания: димиелинизация и вторично прогрессирующая нейродегенерация, вызывающая разрушение аксонов, и гипотеза о параллельном протекании независимых процессов. Известно, что при РС происходит нарушение функционирования митохондрий, сопровождающееся нарушением метаболизма аминокислот и жирных кислот. Наша работа посвящена изучению профиля ацилкарнитинов и аминокислот в сухих пятнах плазмы крови методом ВЭЖХ-МС/МС с целью поиска биомаркеров рецидивирующе-ремиттирующего типа рассеянного склероза (РРРС).

Одним из механизмов димиелинизации является механизм глутаматной токсичности, при которой наблюдается повышение концентрации глутамата в нервной ткани. В нашей работе мы также наблюдали повышенные концентрации глутамата в плазме в группе РРРС (Ср. знач.: 80.1 мкмоль/л, Ст. откл. 95%: 29.9, 22 пациента) по сравнению с контрольной группой (63.0 мкмоль/л и 18.2 соответственно, 22 волонтера). Кроме глутамата были выявлены 4 метаболита, имеющие пониженные концентрации в группе РРРС ($p < 0.05$): лейцин и изолейцин, валин и деценоилкарнитин (C10:1-карнитин). Диагностическая эффективность индивидуальных маркеров (Glu, Leu/Ile, Val, C10:1-карнитин), моделей на основе нескольких маркеров и многовариантных моделей с уменьшением размерности (дискриминантный анализ наименьших квадратов PLS-DA, линейный дискриминантный анализ на основе метода главных компонент) сравнивалась на ROC графиках в кросс-валидации (20 повторов, 5 слоев) на выборке, содержащей 34 образца. 10 образцов были определены в независимую выборку для валидации моделей. Общая линейная модель регрессии (GLM) на основе 5 метаболитов (AUC=0.783) и модель на основе алгоритма Random Forest (RF, AUC=0.769) оказались наиболее эффективными в режиме кросс-валидации на обучающей группе (34 образца, рис 1). Валидация на независимой выборке показала, что модель RF (AUC=0.72) на основе 5 метаболитов имеет самую высокую эффективность из рассмотренных.

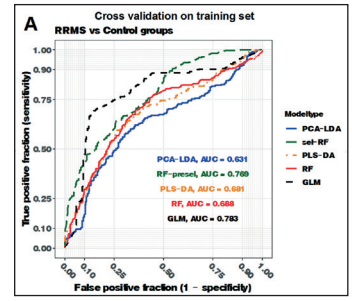


Рис. 1. Сравнение диагностических характеристик моделей в кросс-валидации (20 повторов, 5 слоев) на обучающей выборке (34 образца)

Найденные корреляции в профиле аминокислот и ацилкарнитинов могут быть использованы в дальнейшем при разработке систем поддержки врачебного решения для ранней диагностики РРРС. Наши данные к настоящему времени представляют наиболее полное описание изменений в профиле аминокислот и ацилкарнитинов в плазме крови, связанных с развитием РС.

Исследование было поддержано проектом федерального бюджета № 0309-2019-0007.

Онколитические аденовирусы: новые идеи и разработки

Романенко М.В., Осипов И.Д., Сизова М.А., Нетёсов С.В.

Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

На протяжении последних десятилетий использование аденовирусов в качестве онколитических агентов претерпевало несколько взлётов и падений. На сегодняшний день проведенные клинические испытания показали безопасность аденовирусных препаратов, однако их эффективность оказалась ниже ожидаемой. В связи с этим актуальными задачами для создания аденовирусных онколитиков нового поколения являются внесение в их геном новых модификаций, усиливающих терапевтическую эффективность, а также разработка режимов совместного использования вирусных агентов с другими подходами к борьбе со злокачественными новообразованиями.

Самым распространенным аденовирусным серотипом, на основе которого сконструировано большинство препаратов – аденовирус серотипа 5 (Ad5). Препараты на его основе в настоящий момент находятся на различных стадиях клинических испытаний, среди них стоит отметить ICOVIR-7, Ad5Δ24-RGD, Ad5/3Cox2L-Δ24. Подходы при создании эффективных аденовирусных онколитиков включают в себя встройку в их геномы трансгенов, стимулирующих противоопухолевый иммунный ответ, модификации поверхностных белков, а также использование оболочек, например, из полиэтиленгликоля, для ускользания от предсуществующего иммунного ответа.

Одним из подходов при создании эффективных аденовирусных онколитических агентов является использование альтернативных серотипов, менее распространенных в человеческой популяции. Одним из таковых является серотип 6 (Ad6). Его высокий онколитический потенциал был ранее показан против нескольких типов опухолей: гепатоклеточной карциномы, рака молочной железы, предстательной железы, яичников, а также множественной миеломы. Мы показали, что Ad6 эффективен также против линии клеток карциномы шейки матки *in vivo*, при этом его способность к лизису линии C-33 A значительно превышает таковую Ad5. Кроме того, мы изучили онколитический потенциал Ad6 против клеточной линии U87 (глиобластома) *in vivo* и показали, что он сходен с Ad5 как в отношении ксенографта в целом, так и опухолевых стволовых клеток в частности (было показано с использованием свойства опухолевых стволовых клеток глиобластомы интернализовать флуоресцентно меченный двуцепочечный ДНК-зонд).

Для осуществления модификаций аденовирусного генома нами была разработана схема с использованием рекомбинации *in vitro* In-Fusion, которая позволяет вносить трансгены в любую область генома, а не только в начальную, как известная система AdEasy.

Таким образом, альтернативный серотип аденовируса Ad6 является перспективным онколитическим агентом, разработанная схема получения рекомбинантных вариантов позволит в дальнейшем получить панель модифицированных вирусов-онколитиков нового поколения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-34-20016.

Масштабный анализ микроРНК в биологических жидкостях: поиск маркеров рака для «жидкой биопсии»

Рыкова Е.Ю.[1,2,4], Запорожченко И.А.[1,2], Пономарева А.А.[3], Коношенко М.Ю.[1,2], Брызгунова О.Е.[1,2], Лехнов Е.А.[1,2], Пашковская О.А.[2], Власов В.В.[1], Чердынцева Н.В.[3], Лактионов П.П.[1,2]

1 ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия
2 НИИ патологии кровообращения им. Академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия
3 Томский НИМЦ, Томск, Россия
4 НГТУ, Новосибирск, Россия

Для успешного лечения онкологических заболеваний необходимы методы, пригодные для ранней диагностики рака, прогноза ответа опухоли на терапию и выявления рецидивов. При развитии опухолей выявлены изменения состава внеклеточных нуклеиновых кислот, циркулирующих в крови и других биологических жидкостях (цирНК), что делает перспективной разработку методов «жидкой биопсии» на основе цирНК-маркеров. Поиск маркерных микроРНК крови представляет значительный интерес, поскольку многие микроРНК участвуют в трансформации клеток в качестве онкогенов и онкосупрессоров, при этом циркулирующие микроРНК (цир-микроРНК) стабильны в биологических жидкостях при получении образцов, их хранении и обработке.

Для создания высокоточных диагностических тестов проведено сравнительное исследование цир-микроРНК больных раком предстательной железы (РПЖ), раком легкого (РЛ) и здоровых доноров с использованием масштабного анализа на основе количественной ПЦР на платформе miRCURY LNA miRNA qPCR Panels (Exiqon, Дания). Масштабный сравнительный анализ экспрессии 84-х микроРНК в моче больных РПЖ и пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) относительно здоровых доноров позволил выбрать маркерные микроРНК, определяемые в двух фракциях мочи (супернатант и суммарные микровезикулы мочи). С использованием этих микроРНК разработаны диагностические системы, позволяющие поставить диагноз РПЖ с суммарной точностью 97%. Для выявления маркерных микроРНК при РЛ проведено масштабное исследование 179-ти микроРНК в плазме крови онкологических больных и здоровых доноров. Регрессионный анализ данных показал, что определение 10-ти парных отношений, составленных из 14-ти микроРНК, позволяет диагностировать больных РЛ с высокой эффективностью (AUC=0.979). Таким образом, в настоящей работе показана эффективность высокопроизводительных технологий анализа нуклеиновых кислот для поиска диагностических маркеров рака. Верификация выявленных маркеров проводится методом количественной ПЦР в расширенных группах доноров.

Работа поддержана грантом РНФ № 16-15-00124.

Изменение экспрессии генов в клетках аденокарциномы легких А549, индуцированные экзосомами и микровезикулами крови человека

Савиновская Ю.И., Нуштаева А.А., Савельева А.В., Морозов В.В., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Семенов Д.В.

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

Экзосомы и микровезикулы представляют собой внеклеточные мембранные везикулы диаметром 30 – 100 нм (экзосомы) и 50 – 2000 нм (микровезикулы), выделенные из различных биологических жидкостей организма. Мембранные частицы секретируются клетками различных тканей и органов, включая клетки опухолей человека. Мембранные везикулы содержат белки, липиды, нуклеиновые кислоты.

Целью данной работы является анализ влияния мембранных микро- и наночастиц крови здоровых доноров на жизнеспособность, пролиферацию и экспрессию генов в клетках аденокарциномы легких человека линии клеток А549.

Для получения препаратов мембранных частиц использовали метод последовательного центрифугирования при усилиях 1200g, 16000g и серию ультрацентрифугирования при 160000g. Методом МТТ-теста установлено, что препараты мембранных частиц крови здоровых доноров повышали метаболическую активность и жизнеспособность клеток А549 через 48 ($p < 0,05$) и 72 ($p < 0,001$) часа инкубации. Методом проточной цитометрии показано, что мембранные частицы крови не вызывают апоптотических изменений мембран клеток А549 и не оказывают существенного влияния на пролиферацию.

С использованием метода высокоэффективного секвенирования проведен детальный анализ изменений транскриптома клеток аденокарциномы А549 под действием мембранных частиц крови человека. Для этого РНК клеток, инкубированных с мембранными частицами, и РНК контрольных клеток, выделяли, конструировали кДНК–библиотеки и анализировали методом массового параллельного секвенирования.

Установлено, что инкубация клеток А549 с препаратами мембранных частиц крови здоровых доноров через 6 ч приводит к активации групп генов, которые экспрессия которых остается повышенной через 12 и 24 часа. Эта группа генов контролируется транскрипционным фактором NF-каппа-В.

Гены вторичного ответа, которые активируются после 24 часов инкубации клеток А549 с мембранными частицами крови человека, контролируются не только NF-каппа-В, но и множеством других факторов транскрипции, включая REST и SMC3.

Полученные данные позволяют заключить, что мембранные частицы крови, взаимодействуя с клетками А549 на начальном этапе (6 ч), активируют NF-kappa-B сигнальные каскады, которые в дальнейшем вызывают масштабные изменения экспрессии генов контроля апоптотических процессов и генов формирования секреторных мембранных везикул.

Полученные результаты могут быть использованы для создания новых средств диагностики и терапии заболеваний с использованием мембранных структур – экзосом и микровезикул крови человека.

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН II.1 0309-2018-0015.

Анализ микроРНК экзосом молока

Седых С.Е.[1,2], Пурвиньш Л.В.[1,2], Невинский Г.А.[1,2]

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Экзосомы – везикулы диаметром от 40 до 100 нм. Экзосомы выделены из различных биологических жидкостей: плазмы крови, мочи, слез, молока, а также культуральной жидкости. Известно, что экзосомы содержат белки, липиды, различные формы нуклеиновых кислот. В настоящее время биохимические компоненты экзосом молока изучены значительно менее подробно, чем, например, экзосом плазмы крови или культуральной жидкости. Показано, что состав экзосом значительно зависит от способа их выделения.

Литературные данные указывают на наличие сотен и тысяч молекул различных мРНК и микроРНК в составе экзосом. Ранее мы модифицировали стандартный протокол выделения экзосом, добавив в него стадию гель-фильтрации. Дополнительная очистка позволяет снизить количество совыделяющихся белков и нуклеиновых кислот в препаратах экзосом. В данной работе мы провели анализ содержания микроРНК в экзосомах молока на разных этапах выделения, подобрали подходящие для ПЦР в реальном времени референсные гены.

Полученные результаты могут быть использованы при планировании экспериментов по доставке биологически активных веществ с использованием экзосом молока.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 18-74-10055, госзаданием 0309-2019-0003.

Клеточные технологии в создании терапевтических препаратов: от CAR-клеток до иммортализованных В-лимфоцитов

Филатов А.В.[1,2], Бязрова М.Г.[1,2], Миннегалиева А.Р.[1,2], Лебедин Ю.С.[3]

[1] *ГНЦ Институт иммунологии, Москва, Россия*
[2] *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия*
[3] *ООО «Хема-Медика», Москва, Россия*

Иммунотерапевтические антитела и Т-клетки с химерными рецепторами (CAR-клетки) доказали свою эффективность при лечении ряда онкологических заболеваний. Наиболее успешными они оказались при лечении лимфом и лейкозов. Это связано с тем, что лимфоидные клетки несут на своей поверхности ряд «линейных» антигенов, которые в своей экспрессии ограничены лимфоидными клетками. К таким антигенам относятся маркеры CD19, CD20, CD22 и некоторые другие. Гораздо более скромные результаты были достигнуты при иммунотерапевтическом лечении карцином. Это связано с ограниченным кругом опухолеспецифических антигенов, характерных для этого типа клеток.

Потенциальную возможность для создания CAR-клеток против солидных форм рака предоставляют неоантигены, которые формируются на опухолевых клетках в результате аберрантного гликозилирования. Одним из неоантигенов является Tn-антиген, который не встречается на нормальных клетках, но обнаруживается на 70% карцином. Tn-антиген можно рассматривать как идеальную мишень для иммунотерапии карцином.

С помощью генного редактирования нами получены клетки аденокарциномы MCF-7, дефицитные по гену *Cosmc*, который контролирует корректность О-гликозилирования. Модифицированные клетки отличались аберрантным гликозилированием и в составе белка муцина-1 несли Tn-антиген. Эти клетки были использованы для иммунизации мышей и получения моноклональных антител против Tn-антигена. Получено несколько гибридомных клонов, секретирующих антитела против Tn-антигена. Тонкая специфичность антител будет определена на гликочипах. Гены Ig наиболее аффинных антител будут секвенированы и на их основе будут созданы CAR-клетки. Активность и специфичность CAR-клеток будет тестирована на Tn+ и Tn- мишенях.

Для получения человеческих антител, специфичных в отношении опухолеассоциированных антигенов, нами развивается подход, основанный на стимуляции *in vitro* В-лимфоцитов от иммунных доноров. В этой системе В-клетки стимулируются с помощью интерлейкина 21 (IL-21) в сочетании с молекулой CD40L, экспрессированной на поверхности фидерных клеток. Стимулированные лимфоциты иммортализуются путем стабильной трансфекции генов BCL-6 и BCL-XL. Нами получены несколько иммортализованных линий В-клеток человека, которые можно отбирать по секреции антител заданной специфичности. Предложенный подход позволит получать человеческие моноклональные антитела, пригодные для иммунотерапии опухолей.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 18-29-07025.

Возможности анализа сухих пятен крови для персонализированной медицины

Коваль В.В., Черноносов А.А.

ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Метод анализа в сухих пятнах крови был предложен в 60-х годах прошлого столетия, и долгое время использовался в неонатальном скрининге наследственных заболеваний. Последние 10-15 лет область его применения значительно расширилась. Это связано с тем, что для анализа из сухого пятна крови, как правило, берут диск 3 мм в диаметре, что соответствует объему крови 3 мкл или 1,6 мкл плазмы крови. Для обнаружения таких малых количеств вещества требуется высокочувствительные методы анализа, например, масс-спектрометрия. С развитием доступности масс-спектрометрических методов анализа, технологию сухих пятен крови стали использовать для анализа различных лекарственных препаратов и биомаркеров.

Суть метода заключается в нанесении капли крови на специальную бумагу и высушивании образца. После чего его можно хранить и при комнатной температуре и отправлять почтой в обычном конверте. Изменяя состав растворителя, можно экстрагировать необходимое вещество, сразу отделяясь от большого количества компонентов крови, которые остаются на бумаге. Несмотря на преимущества метода, у него есть и некоторые ограничения, в основном связанные с гематокритом и правильностью забора пробы.

Простота взятия, хранения и транспортировки пробы, позволяет проводить забор образца крови как медицинским персоналом в «полевых» условиях, так и непосредственно дома самим пациентом, что значительно облегчает возможность применения данного метода в персонализированной медицине.

Исследование было поддержано проектом федерального бюджета № 0309-2019-0007.

Платформа для терапии злокачественных заболеваний с помощью панелей онколитических вирусов

Чумаков П.М.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН и Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия

По последние годы активно разрабатываются подходя к использованию вирусов для терапии онкологических заболеваний. Эти подходы основаны на частом приобретении злокачественными клетками повышенной чувствительности к вирусом, связанном, в первую очередь, с нарушениями системы противовирусной защиты за счет индукции интерферонов. Помимо этого механизмы, взаимодействие вирусов с клетками опухоли вызывает существенную активацию противоопухолевого иммунитета и ослаблению иммуносупрессирующего влияния опухолевого микроокружения. Уже созданные штаммы онколитических вирусов демонстрируют в ряде случаев впечатляющие результаты. Однако положительная динамика при терапии единичными штаммами онколитических вирусов отмечается лишь у меньшей части пациентов, что связано с высокой степенью избирательности вирусов в отношении опухолевых клеток. В тоже время, опухолевые клетки, нечувствительные к одному вирусному штамму могут оказаться высокочувствительными к другому штамму. Мы разработали подход к вирусной терапии онкологических заболеваний, который использует большие панели непатогенных вирусных штаммов, обладающих в совокупности широким спектром воздействия на опухоли пациентов. Для индивидуального подбора наиболее эффективных для конкретного пациента вирусных штаммов мы ведем поиск предсказательных биомаркеров, а также подбираем наиболее эффективные комбинации вирусных штаммов, позволяющие добиваться более высоких терапевтических показателей. Кроме этого, мы усовершенствовали способ доставки вирусов в места расположения опухолевых клеток, основанный на использовании клеточных носителей. В настоящее время разрабатываемые подходы проходят тестирование на волонтерах, больных IV стадией онкологических заболеваний, возможности лечения которых традиционными методами было полностью исчерпано. Будут продемонстрированы отдельные примеры успешной терапии с помощью разрабатываемых нами подходов.

Коррекция ошибок при ферментативной сборке протяженных последовательностей ДНК

Шевелев Г.Ю.[1,2], Переверзев И.М.[1,2], Кечин А.А.[1,2], Тупикин А.Е.[1], Пышный Д.В.[1,2]

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Химико-ферментативный синтез последовательностей ДНК длиной около 1 тыс. п.н. имеет большое значение для молекулярной биологии и генной инженерии, поскольку обеспечивает возможность к созданию кодирующих последовательностей нуклеиновых кислот, без использования матрицы ДНК, или РНК. Большинство современных способов синтеза протяженных последовательностей НК de novo основано на использовании олигонуклеотидов, полученных методом твердофазного амидофосфитного синтеза. Как правило, полноразмерную последовательность ДНК разбивают на набор олигонуклеотидов таким образом, чтобы они имели взаимно перекрывающиеся комплементарные концы, позволяющие таким олигонуклеотидам гибридизоваться между собой в условиях реакции ферментативной элонгации, в результате которой синтезируется полноразмерный продукт.

В данной работе исследована структура и причины ошибок, обнаруживаемых в составе генных конструкций. Показано, что большая часть ошибок в составе генных конструкций возникает на этапе синтеза олигонуклеотидов. В работе предложены подходы к минимизации ошибок в составе комплексов ДНК, формируемых на этапе сборки генных конструкций.

Предложенный подход позволяет снизить теоретическое количество клонов, отбираемых для скрининга целевых последовательностей до 10 раз.

Работа выполнена при поддержке проекта базового бюджетного финансирования МОН РФ N 0245-2019-0002 и проекта РНФ 17-74-10157.

Интегрированная инструментальная система анализа, интерпретации и прогнозирования на базе геномных и феномных данных человека

Шлихт А.Г., Краморенко Н.В.

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Интегрированный анализ и интерпретация геномных и феномных данных человека, а также экологических данных, имеет большое значение для диагностики и прогнозирования заболеваний. В работе рассматривается интегрированная интеллектуальная система, построенная на базе экспертных систем (ЭС) интерпретации, диагностики, прогнозирования и поддержки принятия решений. Созданные ЭС объединяют многочисленные омиксные данные о генотипе, фенотипе и окружающей среде, которые позволяют построить множество ассоциативных отношений между генами, протеинами, ферментами, реакциями, метаболитами, метаболическими и сигнальными путями, заболеваниями [1].

Первичными данными ЭС являются как многолетние данные системы мониторинга состояния окружающей среды [2], так и омиксные данные многочисленных мировых порталов (NCBI, KEGG, EBI, GO и др.). Достоинством подхода создания систем интерпретации, диагностики и прогнозирования на базе ЭС является возможность объяснения полученных выводов и заключений. В созданных ЭС объяснение представляется в виде сложной логико-семантической сети, построенной на базе ассоциативных отношений. Базы знаний ЭС реализованы на основе технологии реляционных баз данных, что позволяет применять языки программирования высоко уровня и строить эффективные дружественные интерфейсы, которые позволяют реализовать как автоматический, так и интерактивный режимы взаимодействия с пользователями. В качестве пользователей ЭС могут выступать исследователи (медики, биологи, биохимики, генетики), от которых не требуются знания информатики и программирования.

ЭС осуществляют переход (сжатие) от больших количественных данных (Big data) к малым качественным данным, представляемых в терминологии исследователей. Процесс сжатия производится в автоматическом режиме, на основе многочисленных омиксных баз данных, алгоритмов обработки, интерпретаторов данных, а также систем поддержки принятия решений. Разработан специальный интерпретатор данных, который позволяет осуществлять поиск мотивов, консервативных структур на базе формализованных шаблонов, как типовых (петли, лейциновая молния, цинковые пальцы и др.), так и любых самостоятельно задаваемых структур. Интерпретация геномных данных осуществляется на базе референс генома человека и может быть настроена на любой альтернативный геном.

Созданная система может применяться как для различного рода омиксных исследований, так и для процесса обучения.

1. *Шлихт А.Г., Краморенко Н.В. Цифровизация геном-центрированных метаболических процессов живых организмов. // Матер. всеросс. конф. с междунар. участ. «Биотехнология – медицине будущего». – 2017. – С.114.*
2. *Шлихт А.Г., Краморенко Н.В. Автоматизация процессов мониторинга и управления состоянием окружающей среды и здоровья человека. Владивосток: Изд-во ТГЭУ, 2007. – 324 с.*

Создание перспективных NK-клеточных линий повышенной цитотоксичности для аллогенной противораковой терапии

Юсубалиева Г.М.[1], Кулемзин С.В.[2], Бровкина О.И.[1], Дашинимаев Э.Б.[3], Смагина А.С.[2,4], Кальсин В.А.[1], Коноплянников М.А.[1], Санжаров А.Е.[1], Винокуров А.Г.[1], Баклаушев В.П.[1], Горчаков А.А.[2,4], Таранин А.В.[2,4]

[1] *Федеральный Научно-Клинический Центр ФМБА России, Москва, Россия*
[2] *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия*
[3] *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия*
[4] *Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия*

В последние годы с учетом более глубокого погружения исследователей в опухолевую иммунологию, фундаментальные исследования и клинические применения NK-клеток стали интересной темой для многих мировых лабораторий. Есть данные что аллогенные NK-клетки обладают более сильной способностью уничтожать опухоли, чем аутологичные NK-клетки [Mehta, R.S et all Front. Immunol. 2018]. Некоторой сложностью на пути использования аллогенных NK-клеток и клеточных линий является реакция хозяин-против-трансплантанта, однако её можно предотвратить используя MHC-дефицитные NK-клетки. Кроме того, представляют интерес генетически-модифицированные NK-клетки с повышенным уровнем цитотоксичности. В настоящей работе были скомбинированы оба подхода для получения MHC-негативной NK-клеточной линии YT повышенной цитотоксичности.

В клетки линии YT была интегрирована конструкция для оверэкспрессии белка-позитивного регулятора цитотоксичности Vav1. Полученная линия YT-Vav1 характеризуется многократным превышением количества белка Vav1 по сравнению с родительской клеточной линией, а также другими NK-клеточными линиями, такими как NK-92 и KHYG-1. Цитотокисческая активность YT-Vav1 клеток достоверно возросла и проявляется в отношении модельных раковых линий PC3, DU145, G361, Caco2, а также в отношении пациентных первичных раковых линий. В качестве последних были использованы полученные из операционного материала линии глиобластомы, аденомы простаты, карциномы и мезотелиомы. Все указанные мишени были лизированы YT-Vav1 эффекторами намного быстрее и активнее чем родительскими клетками YT.

Далее на основе полученной линии YT-Vav1, а также клеток YT дикого типа были получены MHC-негативные сублинии. Для этого была выбрана стратегия нокаутирования гена β2-микроглобулина. Из литературных данных известно, что в отсутствие продукта этого гена комплексы MHC I класса не экспонируются на поверхности клеток. При помощи CRISPR/Cas9 платформы было проведено геномное редактирование, при этом эффективность получения нокаутных клеток составила более 70%. Цитотоксическая активность полученных MHC-нокаутных линий YT-Vav1-b2M-/- и YT-b2M-/- была не ниже, чем цитотоксическая активность родительских клеток. В перспективе указанные линии могут стать заделом для разработки доступной противораковой аллогенной NK-клеточной терапии.

Исследование было поддержано грантами РФФИ № 18-29-01022, 17-04-02044

Создание автономно люминесцентных эукариот на основе цикла кофейной кислоты из грибов

Ямпольский И. В.

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

Биолюминесценция – излучение света живыми организмами – широко распространена в природе. По современной оценке, существует около 40 различных химических механизмов «холодного свечения». Излучение кванта света происходит в результате окисления молекулы органического субстрата – люциферина – при катализе ферментом – люциферазой. Среди высших грибов более 100 видов обладают способностью светиться в темноте. За последние годы международной команде исследователей под руководством докладчика удалось расшифровать структуру люциферина высших грибов, а также установить последовательность и клонировать люциферазу грибов и ферменты биосинтеза люциферина.

В докладе будут освещены работы по расшифровке строения люциферина, механизм излучения света, клонирование биолюминесцентных ферментов и раскрыты перспективы их практичского использования.

1. *Petushkov V., Dubinnyi M., Tsarkova A., Rodionova N., Baranov M., др. всего 7 человек. A novel type of luciferin from Siberian luminous earthworm Fridericia heliota: structure elucidation by spectral studies and total synthesis. Angew. Chem. Int. Ed. 2014, P 5566.*
2. *Dubinnyi M., Kaskova Z., Rodionova N., Baranov M., др. всего 9 человек. Novel mechanism of bioluminescence: oxidative decarboxylation outside of light-emitting moiety in luciferin from earthworm Fridericia heliota. Angew. Chem. Int. Ed. 2015, P 7065.*
3. *Purtov K., Petushkov V., Baranov M., Mineev K., Rodionova N., др. всего 17 человек. The chemical basis of fungal bioluminescence. Angew. Chem. Int. Ed. 2015, P 8124.*
4. *Tsarkova A., Kaskova Z. A Tale Of Two Luciferins: Fungal and Earthworm New Bioluminescent Systems. Acc. Chem. Res. 2016, P 2372.*
5. *Kaskova Z., Tsarkova A. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. Chem. Soc. Rev. 2016, P 6048.*
6. *Kaskova Z., Dörr F., Petushkov V., Purtov K., Tsarkova A., др. всего 23 человека. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence, Science Advances, 2017, e1602847.*
7. *Kotlobay A., Sarkisyan K., Mokrushina Y., Marcet-Houben M., Serebrovskaya E., др. всего 42 человека. A genetically encodable bioluminescent system from fungi. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 2018, 115 (50) P 12728.*

Работа поддержана грантом РНФ №17-14-01169.

СИМПОЗИУМ
«БАКТЕРИОФАГИ. УПРАВЛЕНИЕ МИКРОБИОТОЙ»

Immune response to phage and phage-derived products and its effects on phage pharmacokinetics

Krystyna Dąbrowska

Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland

Use of viruses infecting bacteria (bacteriophages or phages) to treat bacterial infections has been ongoing clinically for approximately one hundred years. Despite that long history, along with a growing crisis of resistance to standard antibiotics, phage therapy is not yet a mainstream approach in medicine. One of important issues for phage therapy is phage pharmacokinetics, considered, from the practical point of view, as the difficulties that phages as virions can have in traveling through body compartments toward reaching target bacteria. Traditionally, pharmacokinetics is differentiated into four categories: these are absorption, distribution, metabolism, and excretion. Thus, pharmacokinetics in general comprise drug movement into and within body, along with drug clearance. Immune response to phage is a key factor that shapes phage clearance and thus it importantly contributes to phage pharmacokinetics together with phage ability to enter a system by various administration routes. In spite of the extraordinary diversity of bacteriophages and possible phage applications, phage morphology, phage specificity, phage dose, presence of sensitive bacteria or the characteristics of treated individuals (age, taxonomy) is related to phage bioavailability in animals and humans. However, once phages successfully enter the body, they reach most organs, including the central nervous system. Bacteriophages are cleared mainly by the immune system: innate immunity removes phages even when no specific response to bacteriophages has yet developed. Greater awareness of what obstacles related to pharmacokinetics generally or specifically can exist to phage therapy success, should aid in the further development of phage therapy toward wider use.

Polish experience in clinical phage application

Ryszard Międzybrodzki[1,2,3], Wojciech Fortuna[1,4], Sławomir Letkiewicz[1,5], Paweł Rogóż[1], Beata Weber-Dąbrowska[1,2], Andrzej Górski[1,2,3]

[1] *Phage Therapy Unit, Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland*
[2] *Bacteriophage Laboratory, Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland*
[3] *Department of Clinical Immunology, Transplantation Institute, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland*
[4] *Regenerative and Functional Neurosurgery Unit, Department of Neurosurgery, Wroclaw Medical University, Wrocław, Poland*
[5] *Jan Długosz University in Częstochowa, Poland*

Poland belongs to pioneers of the phage therapy (PT) and its tradition of the phage application in treatment of bacterial infections started just a few years after the World War I and was continued after the World War II. Although Hirszfeld Institute has provided preparations for PT and coordinated it throughout Poland since the late 1960s and according to the Polish regulations PT is still considered as an experimental treatment. In 2005 we have opened a Phage Therapy Unit – the first such center in European Union, where we admit on an out-patient basis patients with different chronic bacterial infections not responding to antibiotic treatment under the rules of a therapeutic experiment. Since that time we have treated for PT over 700 patients. Our clinical results, summarized here, are promising and they confirm general and remote safety of the phage use. Besides, they suggest potential anti-inflammatory effect of bacteriophages independent of their known antimicrobial action. They could be responsible for some good PT results observed in the absence of pathogen eradication.

Russian experience in phage therapy in localized infections

Nina Tikunova, Vera Morozova, Valentin Vlassov

Institute of chemical biology and fundamental medicine, Siberian branch of Russian academy of science, Novosibirsk, Russia

Recent years, an increasing microbial resistance takes place around the world. In Russia, more than 35% of nosocomial infections are multidrug-resistant that requires alternative preparations and approaches for treatment. One of these may be application of bacteriophages. Since 1930-40, bacteriophages have been extensively used for dysentery and typhoid prophylaxis and treatment in the former Soviet Union. When bacteriophages against major causative agents of suppurative inflammation were identified, they have been also applied in surgical practice to treat purulent wounds and post-operative infectious complications. After the advent of various antibiotics, the use of bacteriophages in surgery was significantly decreased in Russia, but not stopped as antibiotic treatment sometimes failed even with antibiotic-sensitive bacteria. The emergence of multidrug-resistant bacteria revived the interest in phage therapy as a possible alternative to traditional antibiotics. The results of phage therapy and complex therapy including phage and antibiotic treatment in clinical practice in Russia will be presented. Data on application of bacteriophages against localized infections such as wound and postoperative infections, burn infections and infections associated with trophic ulcers, including diabetic foot ulcers, will be described.

Персонализированная фаготерапия как составная часть комплексного антибактериального лечения больных с ИСМП

Алешкин А.В.[1,2], Ершова О.Н.[3], Митрохин С.Д.[4], Алехнович А.В.[5], Haverich A.[6], Бочкарева С.С.[1,2], Рубальский Е.О.[1,2,6]

[1] *Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия*
[2] *Кафедра клинической микробиологии и фаготерапии, Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия*
[3] *Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко, Москва, Россия*
[4] *Городская клиническая больница № 67 им. Л.А. Ворохобова, Москва, Россия*
[5] *Центральный военный клинический госпиталь им. А.А. Вишневского Москва, Россия*
[6] *Кафедра кардиоторакальной, трансплантационной и сосудистой хирургии, Высшая медицинская школа Ганновера, Ганновер, Германия*

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), наносят серьезный социальный и экономический ущерб. Наиболее частой причиной ИСМП являются ESCAPE-патогены, устойчивость клинических изолятов которых к различным группам антибиотиков также чрезвычайно высока.

В рамках реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности на базе МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского создан Федеральный научно-методических центр по изучению и идентификации бактериофагов. В качестве примера осуществляемых референс-центром прикладных научных исследований, проводимых в тесном сотрудничестве с клиническими учреждениями может служить разработанная концепция персонализированного подхода к фаготерапии ИСМП.

Изменение штаммов-возбудителей ИСМП влечет за собой необходимость постоянного мониторинга чувствительности используемых бактериофагов и внесение изменений в штаммовый состав фагового коктейля для поддержания необходимого уровня его спектра литической активности. Высокая вероятность проведения повторных курсов фаготерапии заставляет учитывать образование специфических антифаговых антител к уже использованным фагам. Локализация инфекционного процесса и фармакокинетические свойства отобранных для терапии фагов определяют путь введения и лекарственную форму препаратов бактериофагов.

В результате использования разработанного алгоритма персонализированного подбора бактериофагов эффективность санации локусов, инфицированных возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью, повысилась на 50%, составляя, в среднем, в участвующих в инициативном исследовании клиниках 84%.

Нейромодулирующий, иммуномодулирующий и антиоксидативный потенциал микробиом ЖКТ человека

Даниленко В.Н.

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

Микробиота (микробиом) желудочно-кишечного тракта человека трактуется в настоящее время как нейроэндокринный орган, интегрирующий взаимодействие ключевых систем человека: эндокринной, иммунной, нервной системы, а также в значительной степени ответственные за взаимодействие с внешней средой, включая факторы стресса. Все больший объем данных указывает на корреляцию между нарушениями в композиции таксономического состава и как следствие метаболической активности микробиоты и различными заболеваниями: нейродегенеративными, психическими, автоиммунными, онкологическими и др. В последнее время растет понимание о необходимости вычленения, наиболее функционально значимых групп генов-биомаркеров и их метаболических продуктов для последующего использования при полном метагеномном анализе микробиом в норме и патологии [1]. На наш взгляд такими группами могут быть гены, определяющих нейромодулирующую, иммуномодулирующую и антиоксидантную активность [2-4]. На первом этапе, как и для любого другого органа для микробиоты необходимо определить параметры по указанным композициям генов определяющими ее состояние у здоровых людей определенного региона мира. Важной составляющей является формирование каталога генов и их продуктов являющихся биомаркерами, ассоциированными с конкретными заболеваниями. Например, при нейродегенеративных заболеваниях (Альцгеймер, Паркинсон, АСР и др.) важными первичными показателями - биомаркерами могут быть изменены в анти оксидативном потенциале микробиоты. При психических расстройствах (депрессия, шизофрения и т.д.) изменения в нейромодулирующем потенциале. При автоиммунных и онкологических заболеваниях изменения иммуномодулирующего и антиоксидантного потенциала. Важно отметить, что ключевой вклад в нарушение функционирования микробиоты, по-видимому вносят штаммовые и видовые отличия [5] ассоциированные с накоплением определенных генов-биомаркеров. В докладе обсуждаются подходы коррекции микробиоты при различных заболеваниях, а также создания фармабиотиков с нейромодулирующей, иммуномодулирующей и антиоксидантной активностью.

1. *Valles-Colomer M., Falony G., Darzi Y. et al. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. // Nature Microbiol – 2019 – V. 4 – P. 623–632.*
2. *Averina O.V., Danilenko V.N. Human intestinal microbiota: Role in development and functioning of the nervous system // Microbiology – 2017 – V. 86, № 1 – P. 1–18*
3. *Kovtun A.S., Averina O.V., Zakharevich N.V., Kasianov A.S., Danilenko V.N. In silico Identification of Metagenomic Signature Describing Neurometabolic Potential of Normal Human Gut Microbiota // Russian Journal of Genetics. – 2018 – V. 54 - № 9 – P. 1101-1110*
4. *Marsova M.V., Abilev S.K., Poluektova E.U., Danilenko V. N. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of lactobacillus strains from human microbiota // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2018 – V. 34. - № 2. – P. 27.*
5. *Klimina K.M., Kasianov A.S., Poluektova E.U., Emelyanov K.V., Voroshilova V.N., Zakharevich N.V., Kudryavtseva A.V., Makeev V.J., Danilenko V.N. Employing toxin-antitoxin genome markers for identification of Bifidobacterium and Lactobacillus strains in human metagenomes. // PeerJ. – 2019 - Mar 4 - 7:e6554.*

Исследование поддержано грантом ГЗ №0112-2019-0002.

Кластер генов «PFNA» у бифидобактерий, роль в коммуникации с организмом хозяина

Дьяков И.Н.[1], Мавлетова Д.А.[2], Чернышова И.Н.[1], Снегирева Н.А.[1], Гаврилова М.В.[1], Бушкова К.К.[1], Чекалина М.С.[2], Алексеева М.С.[2], Даниленко В.Н.[2]

[1] *Институт вакцин и сывороток им. Мечникова, г. Москва, Россия*
[2] *Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова, г. Москва, Россия*

Бифидобактерии вносят важный вклад в нормальное развитие и дальнейшее поддержание иммунной системы человека. Как клетки, так и метаболиты бифидобактерий проявляют иммунобиологические свойства и способны влиять на иммунный ответ макроорганизма. В то же время микроорганизмы потенциально способны не только влиять на иммунную систему, но и воспринимать от нее сигналы. Подтверждением этому являются отдельные работы, показавшие селективное связывание бактериальными белками цитокинов человека, в частности белком IrmA E. coli. В таком взаимодействии могут участвовать FN3 домены бактериальных белков, структурно сходные с цитокиновыми рецепторами млекопитающих.

Целью настоящей работы явилось проверка выдвинутого ранее предположения о способности белка, содержащего FN3 домены, кодируемого в кластере генов «PFNA» Bifidobacterium longum subsp. longum GT15, взаимодействовать с различными цитокинами in vitro, как компонентами иммунной системы человека.

Ранее коллективом авторов из гена fibronectin type III domain-containing protein B. longum subsp. longum GT15 был клонирован фрагмент 1506 п.н., кодирующий 501 аминокислоту. Белковый продукт этого фрагмента содержит 2 домена FN3. В представленной работе оценивали способность полученного фрагмента белка, содержащего FN3 домены специфически связываться с цитокинами человека методом иммуноферментного анализа. С этой целью был сконструирован сэндвич, позволяющий выявлять специфическое взаимодействие исследуемого фрагмента белка с цитокинами человека. Было установлено, что исследуемый фрагмент белка, содержащий FN3 домены, специфически связывает TNFα, но не IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, IL13.

Добавление in vitro TNFα и IL-6 к культуре B. longum subsp. longum GT15 к in vitro приводило к транзиторному усилению роста микроорганизмов в присутствии TNFα, но не IL-6.

Полученные данные свидетельствуют о том, что B. longum subsp. longum GT15 способны селективно связывать TNFα с помощью белков, содержащих FN3 домены. Вопрос передачи сигнала внутрь бактериальной клетки остается открытым, поскольку исследуемый фрагмент белка, содержащий FN3 домены, выполняет преимущественно адгезивные, но не сигнальные функции. Возможно в этот процесс вовлечены другие рецепторные белки B. Longum.

Серин-треониновые протеинкиназы – потенциальная биомишень для коррекции таксономического состава кишечной микробиоты человека при диабете 2 типа

Захаревич Н.В., Даниленко В.Н.

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

В норме состав кишечной микробиоты (КМ) сбалансирован (по родам и видам), но при различных заболеваниях, в том числе и при диабете 2 типа (Д2Т) таксономический баланс нарушается. В представленном исследовании предлагаются новые биомишени для коррекции таксономического состава КМ – бактериальные серин-треониновые протеинкиназы (СТПК). Воздействовать на бактериальные СТПК можно селективными ингибиторами.

Для поиска СТПК – потенциальных биомишеней, был проведен сравнительный таксономический анализ метагеномных образцов КМ от лиц с Д2Т (114 образцов) и от контрольной группы лиц (126 образцов) (из двух независимых исследований [1,2]). По результатам анализа было отобрано 8 бактериальных родов: *Acidaminococcus, Desulfovibrio, Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Megamonas, Megasphaera, Parvimonas* – чьё количество было увеличено в образцах от людей с Д2Т, по сравнению с контрольной группой. Далее были отобраны СТПК принадлежащие 8 выбранным бактериальным родам. Во всех отобранных СТПК была идентифицирована сигнатура из 9 аминокислотных остатков. На основе определенной сигнатуры СТПК были разбиты на группы согласно разработанной нами ранее классификации [3]. Сигнатуры (а следовательно и группы) отобранных нами СТПК были сопоставлены с сигнатурами характерными для человеческих киназ [4] – так как целью работы является предложить такие СТПК, воздействие на которые будет максимально безопасно для человека. В результате, в качестве кандидатов в биомишени мы можем предложить СТПК из следующих четырех бактериальных родов: *Acidaminococcus* (WP_009015884.1 – идентификатор СТПК из базы данных NCBI), *Desulfovibrio* (WP_062252584.1), *Lactobacillus* (WP_103205347.1), *Leuconostoc* (WP_036087829.1). Предложенные СТПК можно использовать как модели при поиске селективных ингибиторов.

1. *Karlsson F.H., Tremaroli V., Nookaew I., Bergström G., Behre C.J., др. всего 8 человек. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control // Nature. - 2013. - V. 498. - P 99–103.*
2. *Qin J., Li Y., Cai Z., Li S., Zhu J., др. всего 56 человек. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes // Nature. - 2012. - V. 490. - P 55–60.*
3. *Zakharevich N.V., Osolodkin D.I., Artamonova I.I., Palyulin V.A., Zefirov N.S., Danilenko V.N. Signatures of the ATP-binding pocket as a basis for structural classification of the serine/threonine protein kinases of gram-positive bacteria // Proteins. - 2012. - V. 80. - P 1363–1376.*
4. *Захаревич Н.В., Даниленко В.Н. Серин-треониновые протеинкиназы бактерий – потенциальная мишень для регуляции состава микробиоты человека // Вестник РГМУ. - 2017. - №2. - С 20–29.*

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00645 мол_а.

In silico метод для характеризации метагеномной сигнатуры микробиоты кишечника при аутизме

Ковтун А.С.[1,2], Аверина О.В.[1], Полякова С.И.[3], Ребриков Д.В.[3], Даниленко В.Н.[1]

[1] *Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия*
[2] *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия*
[3] *Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

Микробиота кишечника (МК) человека может рассматриваться как самостоятельный орган, оказывающий влияние на организм с помощью оси кишечник-мозг благодаря возможности синтезировать различные активные метаболиты. Изменения в бактериальном составе МК коррелируют с различными нейродегенеративными заболеваниями, такими как расстройства аутистического спектра (РАС). МК может быть охарактеризована совокупностью бактериальных родов и ферментов, участвующих в синтезе важных метаболитов – метагеномными сигнатурами (МС). Изменения в таксономическом разнообразии МК, наблюдаемые при нейродегенеративных заболеваниях, будут влиять на МС. Таким образом, изменения в МС могут служить индикатором развивающейся патологии. В данном исследовании мы разработали алгоритм для выявления изменения в МС, специфичные для пациентов с РАС.

На основании опубликованных данных нами был составлен список из 35 ключевых бактериальных ферментов, участвующих в синтезе метаболитов, коррелирующих с развитием аутизма. Также нами был создан каталог ортологов данных ферментов, состоящий из 437 аминокислотных последовательностей. Далее мы разработали биоинформатический метод для определения МС, характеризующихся данными ферментами и их ортологами. Данный подход был использован для анализа метагенома МК 30 детей с РАС и 20 детей из контрольной группы.

По результатам сравнительного анализа МС были выявлены различия в коровых сигнатурах для ферментов, участвующих в формировании короткоцепочечных жирных кислот, синтезе спермидина, мелатонина ГАМК, триптофана, глутатиона у таких ключевых родов бактерий, как *Clostridium, Megasphaera* и *Prevotella*.

Исследование поддержано грантом РНФ № 17-15-01488.

О антиген энтеробактерий – неспецифический барьер и специфический рецептор для фаговой инфекции

Летаров А.В.[1,2], Голомидова А.К.[1], Куликов Е.Е.[1], Иванов П.А.[1], Летарова М.А.[1], Белалов И.Ш.[1]

[1] *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия*
[2] *Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Большинство имеющихся на рынке или разрабатываемых препаратов для фаговой терапии бактериальных инфекций основаны на использовании природных изолятов вирулентных бактериофагов, активных *in vitro* против соответствующих патогенов. При этом широта хозяйского спектра относительно рабочих (как правило, плохо охарактеризованных) наборов клинических изолятов зачастую является одним из ведущих критериев подбора кандидатных фагов.

Наши исследования взаимодействия фагов *E. coli* с поверхностью клетки хозяина показали, что большинство типов О антигенов, встречающихся у полевых изолятов *E. Coli*, служат высокоэффективным неспецифическим барьером, способным обеспечить практически полную устойчивость к фагам. Эта устойчивость достигается несмотря на наличие подходящего белкового рецептора на поверхности внешней мембраны. Бактериофаги преодолевают этот барьер с помощью нескольких механизмов, в большинстве случаев основанных на специфическом распознавании определенных типов О анти-гена фаговыми рецептор-распознающими белками (RBP). Это приводит к резкому сужению спектра хозяев по сравнению с потенциально возможным. Нами изучены фаги, реализующие различные стратегии инфекции. У некоторых вирусов, например у G7C-подобных фагов, распознавание и ферментативная модификация О-полисахарида (ОПС) является необходимой фазой, без которой вирус не может связаться с конечным рецептором. У T5-подобных бактериофагов, таких как DT57C, взаимодействие с О антигеном необходимо, напротив, лишь для обеспечения возможности контакта главного RBP с белковым рецептором. Мы также продемонстрировали, что О антиген критически ограничивает контакт с конечным рецептором и у Stx-конвертирующего фага ф24В, что может иметь существенное значение для эпидемиологии и патогенеза токсикоинфекций, вызванных шигатоксигенными штаммами *E. coli*.

С помощью созданной нами экспресс-методики анализа профилей ЛПС, мы показали, что возникающие клоны бактерий, отобранные на устойчивость к фагам с разными стратегиями, обладают различным статусом экспрессии О антигена, что оказывает влияние на устойчивость таких штаммов к ряду бактерицидных агентов и факторов иммунитета.

В то же время, ряд фагов, например RB49-подобные миовирусы реализуют иную стратегию проникновения сквозь неспецифический барьер клетки, что позволяет им инфицировать штаммы с несколькими весьма различными структурами ОПС. В настоящее время тонкие механизмы, лежащие в основе этой третьей стратегии взаимодействий фаг-клетка, остаются неизвестными, хотя имеющиеся данные позволяют предложить некоторые гипотезы.

Работа поддержана грантом РНФ 15-15-00134П.

Антиоксидантная активность лактобацилл микробиоты ЖКТ человека в профилактике нейродегенеративных заболеваний

Марсова М.В., Полуэктова Е.У., Даниленко В.Н.

Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова, г. Москва, Россия

Оксидативный стресс является универсальным механизмом тканевого повреждения и лежит в основе множества хронических и возрастных заболеваний, в том числе нейродегенеративных. Во многих исследованиях показана корреляция изменений кишечной микрофлоры и тяжести проявления соответствующих симптомов. Лактобациллы, являясь важным компонентом симбиотической микрофлоры и обладая определенным антиоксидантным потенциалом, способны вносить существенный вклад в поддержание антиоксидантного статуса организма-хозяина. Болезнь Паркинсона (БП) является распространенным заболеванием нейродегенеративного спектра, одним из спусковых механизмов развития которого является оксидативный стресс в нейронах черной субстанции головного мозга. Одной их стандартных моделей БП является токсиновая модель, основанная на введении нейротоксинов MPTP или параквата опытным животным, где, проникая в клетки мозга, действуют как редокс-циклирующие агенты, вызывая массированный оксидативный стресс.

В нашей работе, в результате скрининга коллекции лактобацилл при помощи биолюминесцентной тест-системы на основе трансгенного штамма Escherichia coli MG1655, был отобран ряд штаммов, проявляющих антиоксидантную активность в отношении супероксид-аниона [1]. Антиоксидантная активность отобранных лактобацилл исследовалась in vivo на нематодах *C.elegans* в условиях окислительного стресса, индуцированного 50 мМ раствором параквата, где штамм *Lactobacillus fermentum* индуцировал продление медианной продолжительности жизни нематод на 25-30%, и на модели раннего паркинсонизма у мышей C57BL6, где предотвратил деградацию активных допаминовых нейронов черной субстанции мозга мышей и связанные нарушения координации движений в поведенческом тесте «спуск с шеста». Полученные результаты открывают возможности для эффективной профилактики и лечения БП на ранних стадиях.

Было проведено полногеномное секвенирование генома штамма *Lactobacillus fermentum*. Выявлены группы генов, ответственных за синтез белков, ответственных за поддержание антиоксидантного баланса клетки, а так же нехарактерных для данного вида лактобацилл ферментов, стабилизирующих ионы меди и железа.

Отобранные по антиоксидантным свойствам пробиотические штаммы могут являться эффективным и безопасным компонентом средств профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний.

1. *Marsova M.V., Abilev S.K., Poluektova E.U., Danilenko V.N. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of lactobacillus strains from human microbiota.// World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34:27.*

Применение бактериофагов в персонализированной терапии локализованных инфекций

Морозова В.В.[1], Козлова Ю.Н.[1], Ганичев Д.А.[2], Яковец Е.А.[3], Морозов В.В.[3], Павлов В.В.[4], Тикунова Н.В[1]

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
2 НУЗ Дорожная клиническая больница на ст. Новосибирск-Главный ОАО «РЖД» Новосибирск, Россия
3 АНО «Центр новых медицинских технологий», Новосибирск, Россия
4 ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л.Цивьяна» «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, Новосибирск, Россия

Одним из перспективных подходов к решению проблемы антибиотикорезистентности является использование бактериофагов, способных уничтожать бактерии, но не способных заразить человека. Бактериофаги обычно являются видоспецифичными, поэтому основным критерием применения терапевтического бактериофага должна быть чувствительность бактериального агента к бактериофагу. Это требует быстрого и качественного микробиологического анализа, быстрого подбора соответствующего терапевтического фага или коктейля, микробиологического контроля лечения. В ИХБФМ СО РАН разработан подход к персонализированному применению фаговых препаратов. Выделен и охарактеризован ряд оригинальных и уникальных бактериофагов, эффективных против широкого спектра бактерий. Было разработано несколько новых фаговых коктейлей, в том числе уникальный полиспецифический коктейль, содержащий бактериофаги против 11 видов патогенных и нозокомиальных бактерий. Получены клинические данные по персонализированному применению фаговых препаратов для лечения бактериальных инфекций различной локализации, в том числе язв диабетической стопы, инфекций мочевыводящих и дыхательных путей. Применение фаготерапии в клинике обеспечило исчезновение патогена и/или выздоровление у большинства пациентов, заболевания которых были вызваны резистентными бактериями, а предыдущая антибиотикотерапия оказалась безуспешной.

Работа выполнена при поддержке Проекта КП ФНИ СО РАН II.1 (ГЗ № 0309-2018-0011).

Применение препаратов бактериофагов при лечении перипротезной инфекции

Фёдоров Е.А.[1], Самохин А.Г.[1], Павлов В.В.[1], Кретьен С.О.[1], Козлова Ю.Н.[2], Морозова В.В.[2], Тикунова Н.В.[2]

[1] *ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Россия*
[2] *ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

В настоящее пилотное ретроспективное нерандомизированное сравнительное гипотезопорождающее исследование было включено 28 пациентов с перипротезной инфекцией (ППИ) после эндопротезирования тазобедренного сустава (ТБС), которым было проведено хирургическое лечение в объеме одноэтапного цементного ревизионного эндопротезирования ТБС с обязательной прессутизацией цемента и дренированием раны с установкой дренажей, выводимых на боковую поверхность бедра. В группу исследования были включены 12 пациентов (8 женщин и 4 мужчин, средний возраст 58,4±16,9 лет), которым было проведено хирургическое лечение с одновременным назначением этиотропного лечения инфекции в виде комбинации антибиотико- и фаготерапии (АБФТ) в течение 10 суток после операции. Препарат бактериофага (ФГУП НПО «Микроген», Россия) после предварительного тестирования чувствительности к выделенному микроорганизму вводили в дренажи в объеме до 20 мл. В группу сравнения вошли 16 пациентов (7 женщин и 9 мужчин, средний возраст 55,0±11,0 лет), которым было проведено хирургическое лечение с одновременным назначением этиотропного лечения инфекции только в виде антибиотикотерапии (АБТ).

Этиотропная АБТ в послеоперационном периоде была дополнительно назначена на срок до 12 недель по утвержденным схемам. Критерием наличия ППИ были лабораторные признаки синдрома системного воспаления: увеличение содержания С-реактивного белка (СРБ), ускорение скорости оседания эритроцитов (СОЭ), которые оценивали на 2-3, 7 и 10-14 сутки после операции, а также положительный результат бактериологического исследования. Титр бактериофагов в биоматериале пациента определяли на 2-ые, 4-ые и 10-е сутки после начала АБФТ.

При *внутригрупповом сравнении* в обеих группах пациентов величины СРБ и СОЭ возросли уже на 2-3 сутки после операции, с последующим снижением до конца срока наблюдений. В группе исследования содержание СРБ показало значимое снижение с 7-ых до 10-14-ых суток практически в 2,2 раза (p = 0,009) до 14,79 [10,87; 26,22] мг/л, и аналогичным образом значимое различие было зарегистрировано в этой же группе по величине СОЭ в указанном промежутке времени – снижение в 1,18 раза (p=0,001) до 66,5 [53,50; 79,50] мм/ч. В группе сравнения при анализе тех же параметров значимых различий не отмечено. В ходе выполнения *межгруппового сравнения* статистически значимых различий во всех временных точках измерений не выявлено, однако, тенденция к последовавшему на 10-14-ые сутки после ревизионной операции более быстрому снижению содержания СРБ в группе исследования косвенно указывала на возможно более эффективное подавление инфекционного процесса при использовании комбинированной АБФТ.

О природе аутизма

Полетаев А.Б.

МИЦ Иммункулус, Москва, Россия

Термин аутизм (РАС) объединяет гетерогенную группу СИСТЕМНЫХ изменений, затрагивающих не только ЦНС, но и другие органы тела, включая желудочно-кишечный тракт, поджелудочную железу и органы малого таза. Некоторые моногенные и хромосомные болезни сопровождаются аутистичной симптоматикой и их не вполне корректно относят к «генетическому аутизму». Большинство случаев РАС (97-98%) не связано с дефектами генома и относятся к своеобразной патологии внутриутробного развития, формируемой под влиянием химических или инфекционных агентов, действующих опосредованно через изменения, в частности, иммунные в организме беременной. Иммунные изменения, индуцированные влияниями Среды, проявляются в нарушениях продукции цитокинов и естественных аутоантител, что в свою очередь вызывает системные нарушения развития разных органов и тканей плода, характерные для РАС. Степень выраженности нарушений со стороны ЦНС и других органов и систем во многом зависит от индивидуальной резистентности плода и этапов внутриутробного развития, на которые приходится основное патогенное воздействие. В части случаев, сформировавшиеся во внутриутробном периоде нарушения, могут длительное время оставаться латентными (скомпенсированными) и не проявляются или почти у ребенка первых лет жизни. Однако, острые инфекционные заболевания, вакцинация, стрессы или иные провоцирующие влияния, в первые 1-3 года жизни могут вызвать срыв компенсации. В таких случаях у ребенка происходит внезапный регресс, затрагивающий психомоторное и речевое развитие, и появляющийся др. изменения, типичные для РАС. Перспективными маркерами РАС, пригодными для массового скрининга, является ряд аутоантител, лежащие в основе и/или сопровождающие развитие РАС. Анализ изменений профилей иммунореактивности таких аутоантител в сыворотке крови, позволяет выявлять женщин группы риска по рождению детей с РАС до планирования ими беременности, а также выявлять детей группы риска РАС уже в первые месяцы их жизни. Массовый скрининг на характерные изменения детей вызывающих опасения, как и женщин группы риска (планирующих беременность и беременных), может стать фактором снижения частоты РАС и, возможно, других форм врожденной патологии, не обусловленной дефектами генома. При этом важно не только использовать опережающую диагностику, но и адресно назначать мероприятия по устранению выявленных нарушений.

Аутизм – клинические проявления, микробиота, формирование когорт для мета-анализа

Полякова С.И.[1], Коровина Н.Ю.[2], Даниленко В.Н.[3], Аверина О.В., Ковтун А.[3], Ефимов Б.А.[1], Селезнева М.А.[1]

[1] *ФГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*
[2] *НПЦ детской психоневрологии ДЗ Москвы, Москва, Россия*
[3] *НИОГЕН АН РФ, Москва, Россия*

Актуальность: Роль кишечной микробиоты в поддержании здоровья человека заключается не только в обеспечении симбионтного пищеварения, но и ряд других физиологических функций, обеспечивающих развитие интеллекта, иммунологической толерантности и поддержании обменных процессов.

Социальная значимость исследования заключается в лавинообразном ухудшении эпидемиологических показателей расстройствами аутистического спектра (РАС) во всем мире.

Этапы становления микробиоты ЖКТ совпадают с развитием мозга, а именно второй сигнальной системы, обладая определенной специфичностью в первые месяцы жизни, в раннем младенческом возрасте, в дошкольном возрасте, когда сохранены пластичнсть мозга и изменчивость микробиома. К сожалению упущенные возможности коррекции интеллекта и социального поведения а детей с РАС, как самых молодых в филогенезе систем, в возрасте после 5 лет все более затруднительны. То есть, у специалистов есть очень небольшое терапевтическое «окно» для воздействия на ось «кишечник- микробиота-мозг».

Целью исследования является метагеномный анализ энтеральной микробиоты у детей с РАС с целью выявления микробных генов нейроактивных соединений. Экспрессия генов представителей микробиоты зависит от видового разнообразия, ее количества и функциональной активности. Логическая цепочка подразумевает зависимость микробиоты от пищевого поведения, пищевого рациона, приема антибиотиков, микроэкологического окружения.

В исследование включены 80 пациентов в возрасте от 2 до 5 лет, соотношение мальчиков и двочек 4:1.

Оценка тяжести аутизм проводилась по ретинговой шкале опросника CARS, отдельно выделены пищевое поведение, развитие речи, невербальных коммуникаций, эмоциональной привязанности к родителям, сохранность инстинкта самосохранения, особенности пищевого рациона и соответствующий ему нутритивный статус ребенка , диспепсические жалобы, нарушения стула, моторного развития детей.

Проанализированы показатели биохимического анализа крови, гемограммы, аминокислотного спектра, уровня аммония.

В соответствии с многозадачностью исследования выделены основные когорты пациентов – по тяжести аутизма, вербальности, наличию стереотипий и нарушению пищевого поведения. Эти градации не являются окончательными и в ходе исследования могут быть пересмотрены.

Фаготерапия в клинике кардиоторакальной и трансплантационной хирургии

Рубальский Е.О.[1,2,3], Ruemke S.[1,2], Salmoukas C.[1,2], Алешкин А.В.[3], Kuehn C.[1,2], Haverich A.[1,2]

[1] *Кафедра кардиоторакальной, трансплантационной и сосудистой хирургии, Высшая медицинская школа Ганновера, Ганновер, Германия*
[2] *Центр биомедицинской инженерии, исследований и разработок имплантов Нижней Саксонии, Ганновер, Германия*
[3] *Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия;*

Бактериальные инфекции, ассоциированные с медицинскими имплантируемыми устройствами или с медикаментозной иммуносупрессией, являются одними из самых сложных осложнений современной хирургии. Стандартная антибактериальная терапия часто является недостаточной для лечения таких случаев не только из-за растущей множественной антибиотикорезистентности бактерий, но и развития антибиотикотолерантности вследствие локальной или системной несостоятельности факторов иммунной системы. Индивидуально подобранные бактериофаги и их коктейли являются одной из действующих альтернатив или дополнений антибиотикотерапии.

В рамках терапии *ultima ratio* мы успешно подготовили и применили персонализированные препараты бактериофагов. Фаготерапию получали больные с инфекциями легких и мягких тканей на фоне медикаментозной иммуносупрессии, а также с инфицированными имплантированными протезами дуги аорты, инфузионными помпами и левожелудочковыми устройствами вспомогательного кровообращения. Проведенная фаготерапия показала свою перспективность и способность элиминировать такие инфекции при использовании адекватного способа и режима введения препаратов бактериофагов.

Phage therapy in the clinics of cardiothoracic and transplantation surgery

Rubalskii E.[1,2,3], Ruemke S.[1,2], Salmoukas C.[1,2], Aleshkin A.[3], Kuehn C.[1,2], Haverich A.[1,2]

[1] *Department of Cardiothoracic, Transplantation and Vascular Surgery, Hannover Medical School, Hannover, Germany*
[2] *Lower Saxony Centre for Biomedical Engineering, Implant Research and Development, Hannover, Germany*
[3] *Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia*

Bacterial infections associated with implanted medical devices or with a medicamental immunosuppression are one of the most severe complications of modern surgery. Conventional antibacterial therapy often is not enough for treatment of such cases not only because of emerging of multiple antibiotic resistance but also because of development of antibiotic tolerance due to local or systemic failure of immune system factors. Individually selected bacteriophages and their cocktails are of viable alternatives or additions to antibiotic therapy.

We successfully prepared and applied personalized phage preparations as an *ultima ratio* therapy. The phage therapy was obtained by patients with infections of lungs and soft tissues after a medicamental immunosuppression as well as with infected implanted aortic arch grafts, infusion pumps and left ventricular assist devices. The phage therapy showed its prospects and ability to eliminate such infections when using an adequate method and route of administration of bacteriophage preparations.

Микробиом (микробиота) при синдроме раздраженного кишечника: пути коррекции

Суворов А.Н.[1,2], Соловьева О.И[3]., Котылева М.П.[1], Цапиева А.Н.[1], Карасева А.Б.[1], Кондратенко Ю. Д.[2], Лапидус А.Л.[2], Ермоленко Е.И.[1,2]

[1] *ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия*
[2] *Санкт-Петербургский Государственный университет, Санкт Петербург, Россия*
[3] *Северо-Западный медицинский университет, Санкт Петербург, Россия*

Синдром раздраженного кишечника (СРК) относится к наиболее распространенным патологиям организма человека, сопровождающийся нарушением микробиоценоза [1]. Микробная терапия рассматривается в качестве одного из эффективных подходов к лечению данного состояния. Настоящее исследование посвящено оценке перспективности применения индивидуальной микробной терапии при СРК (аутопробиотками). Аутопробиотики – генетически проверенные штаммы представителей собственной микробиоты выделяли из кала, выращивали в виде молочно-кислых заквасок и предоставлялись пациентам либо в жидкой, либо в капсульной форме. Штаммы аутопробиотиков закладывались в криохранилище. Всего в исследовании приняло участие 40 пациентов с СРК и 10 волонтеров. Пробы от участников исследования анализировали методами бактериологии, при помощи ПЦР-РВ и посредством метагеномного анализа. Исследования показали существенные отличия в составе микробиоты у пациентов с СРК от группы контроля. Клинически у пациентов, получавших аутопробиотик, наблюдалось уменьшение выраженности вегетативных проявлений болезни: укорочение интервала между дефекациями (у 100%), уменьшение общей слабости (у 75%), уменьшение или исчезновение тошноты после приема пищи (у 90%), уменьшение дискомфорта в животе после приема пищи (у 85%). Наблюдалась элиминация тенденций к запорам. Анализ состава микробиоты показал, что в результате терапии аутопробиотиками увеличение количества эшерихий, клебсиелл, *Clostridium difficile* и *C.perfringens*, характерное для больных с СРК сменялось возрастанием количества лактобацилл и *Faecalibactrium prausnitzii*. В целом в результате исследования на категории больных с СРК была показана эффективность персонифицированной микробной терапии, проявлявшейся в частичном, но существенном, восстановлении основных параметров микробиоценоза.

1. Bhattarai Y, Muniz Pedrogo DA, Kashyap PC. Irritable bowel syndrome: a gut microbiota-related disorder? // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2017. V. 312(1).- P 52–62.

Исследование было поддержано грантом РНФ №16-15-10085.

Изменение кишечного микробиома пациентов с язвенным колитом после трансплантации кишечной миробиоты

Тикунов А.Ю.[1], Морозов В.В.[1], Швалов А.Н.[2], Бардашева А.В.[1], Шрайнер Е.В.[1], Максимова О.А.[3], Волошина И.О.[3], Морозова В.В.[1], Власов В.В.[1], Тикунова Н.В.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*
[2] *ФГБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора РФ, Кольцово, Россия*
[3] *Общество с ограниченной ответственностью «Центр персонализированной медицины», Новосибирск, Россия*

Микробиота кишечника человека - это динамическая система, находящаяся под воздействием внутренних факторов хозяйского организма и внешних факторов, и нарушения кишечной микробиоты, возникающие под действием этих факторов, могут привести к патологическим состояниям, включая воспалительные и онкологические заболевания желудочно-кишечного тракта. Одним из возможных способов воздействия на микробиоту кишечника является фекотрансплантация (ФТ) – введение кишечной микробиоты от здорового донора в кишечный тракт пациента. В настоящее время в ряде стран этот метод используется для нормализации микробиоты кишечника, в основном, при хронических воспалительных заболеваниях кишечника. В России уже несколько лет ведутся пилотные исследования эффективности ФТ при язвенном колите, начатые в Новосибирске. Цель данного исследования – оценить изменение микробиома кишечника е 20 пациентов с язвенным колитом после однократного проведения ФТ. Основной метод – это сравнительный анализ библиотек последовательностей 16S рибосомальной РНК, созданных на основе образцов, полученных от пациентов с язвенным колитом до и после ФТ и секвенированных на платформе Illumina MiSeq. Результаты исследования показали, что проведение ФТ привело к увеличению среднего биоразнообразия последовательностей в образцах, полученных после ФТ по сравнению с образцами, собранными до ФТ, хотя разница не была статистически достоверной. Доля последовательностей Firmicutes, являющихся доминирующей компонентой кишечной микробиоты здоровых людей, была снижена (~ 32 % vs. > 70 %), а доля последовательностей Proteobacteria – увеличена (> 9 % vs. < 5 %). В некоторых образцах, собранных до ФТ, были обнаружены последовательности патогенных представителей Firmicutes и Proteobacteria, включая, *Acinetobacter spp., Enterococcus spp., K. pneumoniae, P. mirabilis, S. aureus, St. maltophilia, Streptococcus spp*. В большинстве случаев после ФТ доля таких последовательностей резко сократилась. Исключение составили последовательности *C. difficile*, доля которых была < 0.5 % последовательностей в образцах от почти половины пациентов, и после ФТ доля таких последовательностей *C. difficile* значительно уменьшилась лишь у трех пациентов. Следует отметить, что после ФТ повысилась на порядок доля *Lactobacillus spp.*, и существенно расширился их видовой состав. По результатам исследования можно сделать предварительное заключение о том, что даже однократная процедура ФТ может привести к повышению биоразнообразия микробиоты пациентов и оптимизации ее таксономического состава.

Биоинформационный анализ путей регуляции экспрессии генов предрасположенности к аутизму

Клименко А.И., Трифонова Е.А.*, Лашин С.А., Кочетов А.В.

Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Аномальная генетическая гетерогенность расстройств аутистического спектра (РАС) обуславливает важность идентификации и исследования сигнальных путей и молекулярных механизмов, отвечающих за формирование этого фенотипа. В настоящее время гены предрасположенности к РАС наиболее полно представлены в базе данных SFARI (Simon's Foundation Autism Research Initiative) Gene, содержащей 1053 гена, из которых 84 обуславливают развитие синдромного аутизма. Большая часть хорошо изученных на сегодня форм синдромного аутизма связана с нарушениями регуляции сигнального пути mTOR (гены mTOR-регуляторы), который является глобальным модулятором трансляции (Ebrahimi-Fakhari, Sahin, 2018). Полное подавление mTOR снижает трансляцию до 65%, но известно, что некоторые мРНК имеют повышенную чувствительность к mTOR, существует несколько типов таких мРНК (Gandin et al., 2016), мы в своей работе объединили их и назвали в целом mTOR-модулируемыми. Следующая категория генов, представленность которой мы оценивали в SFARI – мишени FMRP (Gkogkas and Sonenberg, 2013) – не является вполне независимой, так как FMRP функционально взаимодействует с mTORC1, следовательно, все мишени FMRP зависят в своей трансляции от mTOR. Последняя категория – гены, транскрипция которых регулируется витамином Д3 (Wang et al., 2005). Мы провели биоинформационный анализ базы данных SFARI, и по результатам анализа гены были разделены на 5 категорий.

Категория генов	Number of genes
FMRP мишени	258
mTOR-сигналинг (регуляторы)	42
mTOR- сигналинг (модулируемые)	314
Витамин D-зависимые	223
Вне категорий	447

Оказалось, что из 1053 генов, входящих в базу данных SFARI Gene, 606 (≈58%) можно отнести к одной из четырех групп, а 447 не относятся ни к одной из выделенных категорий.

Отдельный интерес представляют гены предрасположенности к аутизму, относящиеся более чем к одной категории, так, только три гена оказались одновременно мишенями витамина Д3, FMRP и mTOR, а также mTOR-регуляторами: PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), APC (adenomatous polyposis coli) и DOCK1 (dedicator of cytokinesis). Два из трех этих генов достаточно хорошо изучены, один из которых (PTEN) является известным индуктором синдромного аутизма, но удивительно то, что проявления мутаций в этих генах приводит к очень сходному фенотипу, характерному в целом и для идиопатического аутизма: увеличение плотности дендритных шипиков и сходные нарушения функций синапсов.

Дерегуляция локальной трансляции в синапсах является одним из основных патологических механизмов аутизма. В то же время, общей чертой всех генов предрасположенности к аутизму является их низкая пенетрантность, то есть наличие мутации в практически любом гене из SFARI не означает высокой вероятности аутизма ее носителя. Можно предположить, что именно гиперактивация mTOR-зависимой трансляции определяет уровень экспрессии генов предрасположенности к аутизму. Выявление основных экологических активаторов mTOR может помочь понять причины растущей частоты ASD и других mTORопатий. Одним из модуляторов активности mTOR, как недавно было показано, является микробиом млекопитающих (Fu et al., 2017).

* *автор для переписки e-mail: trifonova.k@rambler.ru*

Сравнительное исследование взаимодействия бактериофагов различных морфологических вариантов с макроорганизмом

Чечушков А.В.[1,2], Козлова Ю.Н.[1], Морозова В.В.[1], Фофанов М.В.[1], Тикунова Н.В.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия*

Бактериофаги являются перспективным средством антибактериальной терапии. Несмотря на то, что, они не способны инфицировать эукариотические организмы, в настоящее время ясно, что они могут взаимодействовать с иммунной системой макроорганизма, что может сопровождаться как серьезными нежелательными последствиями, так и обладать отдельными преимуществами при терапии инфекционных заболеваний. Несмотря на то, что подобные взаимодействия описаны для отдельных бактериофагов, в настоящий момент все еще не ясны факторы, влияющие на характер взаимодействия бактериофагов с иммунной системой. В частности, неизвестно, зависит ли такое взаимодействие от компартментализации фагов в макроорганизме и от чего зависит сам характер компартментализации, как компартментализация влияет на параметры адаптивного иммунного ответа.

В настоящей работе мы впервые провели сравнительный анализ иммуногенности и распределения в организме экспериментальных животных бактериофагов четырех различных морфологических вариантов. В исследовании были использованы хвостатые бактериофаги порядка *Caudovirales* семейств *Podoviridae* (протейный бактериофаг PM16), *Myoviridae* (клебсиельный бактериофаг KP179, *Siphoviridae* (протейный бактериофаг PM135), а также нитчатый бактериофаг семейства *Inoviridae* (бактериофаг E.coli M13K07). Исследование проводили на самцах мышей линии ICR возрастом 3 месяца.

При исследовании распределения бактериофагов в организме после внутрибрюшинного введения обнаружено свойство всех бактериофагов за исключением KP179 накапливаться в селезенке в течение 24 часов. При этом KP179 вообще не был обнаружен в тканях мышей. M13, напротив, был обнаружен в одинаковом количестве во всех органах животных. Количество специфических IgG после иммунизации бактериофагами убывало в ряду: M13>PM135>KP179>PM16. В то же время, независимо от накопления в тканях бактериофаги не индуцировали активацию иммунной системы, что проявлялось в стабильности профиля провоспалительных цитокинов через 24 часа после введения.

Полученные результаты указывают на наличие связи между размерами бактериофагов и их компартментализацией в организме животных. Аналогичная связь прослеживается между размером бактериофагов и адаптивным иммунным ответом, проявляющимся в формировании антител класса IgG. Адаптивный иммунный ответ в данном случае является функцией концентрации бактериофагов в тканях (главным образом в селезенке), но не зависит от специфической способности бактериофагов стимулировать провоспалительное состояние иммунной системы, что подтверждается отсутствием влияния бактериофагов на цитокиновый профиль животных.

Микробиота и депрессия. Поиск психобиотиков для коррекции депрессивных состояний

Юнес Р.А.[1], Полуэктова Е.У.[1], Васильева Е.В.[2], Ковалев Г.И.[2], Даниленко В.Н.[1]

1 Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова, Москва, Россия
2 Институт фармакологии им. В. В. Закусова, Москва, Россия

В многочисленных опытах на животных и отдельных работах на людях показано, что существует двунаправленное взаимодействие – нейроиммунное, нейроэндокринное, невральное - между кишечной микробиотой (т.е. совокупностью микроорганизмов, населяющих кишечно-желудочный тракт) и мозгом, в частности при заболевании депрессией. Сформулировано и доказано существование оси микробиота-кишечник-мозг. Получены достоверные свидетельства того, что отдельные штаммы бактерий, прежде всего бифидобактерии и лактобацилл, влияют на функционирование ЦНС, поведение, восприятие боли и когнитивные функции человека и животных. На основе этих штаммов начата разработка пробиотиков, чье действие направлено на центральную нервную систему – психобиотиков. Однако механизм действия штаммов и алгоритм их поиска остаются неизвестными. Возможными посредниками между бактериями и макроорганизмом человека или животного являются различные секретируемые бактериями соединения, в том числе гамма-аминомасляная кислота – ГАМК, основной тормозной нейромедиатор ЦНС. Мы показали, что определенные виды и штаммы лактобацилл и бифидобактерий способны синтезировать ГАМК, и предположили, что такие штаммы могут быть использованы для поиска психобиотиков. Были отобраны штаммы *L. plantarum* и *B. adolescentis*, синтезирующие ГАМК и обладающие важными пробиотическими свойствами (антагонистической активностью по отношению к условно-патогенным штаммам, антиоксидантными свойствами). Геном штаммов был секвенирован, было показано наличие в нем генов, определяющих синтез рибофлавина, триптофана, фолатов, линолевой кислоты, витамина B6, бактериоцинов и ряда генов, определяющих деградацию крахмала, гликанов, гликогена. На основе штаммов была создана пробиотическая композиция. Введение этой композиции мышам линии BALB/c в течение двух недель снижало проявления депрессивноподобного поведения в тесте принудительного плавания и было сходно с действием флуоксетина. Данная композиция может быть в дальнейшем использована в качестве психобиотика.

СИМПОЗИУМ «СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ: ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОЕКТА СКИФ»

Возможности ЭПР для исследования структуры нуклеиновых кислот и их комплексов с протеинами

Елена Багрянская[1,2]

[1] *Новосибирский институт органической химии имени Н.Н.Ворожцова СО РАН, проспект Лаврентьева 9, Новосибирск, 630090, РФ*
[2] *Новосибирский Государственный Университет, Пирогова 2, Новосибирск, 630090, РФ*

В последние годы импульсная дипольная спектроскопия ЭПР в сочетание с направленным введением спиновых меток широко применяется для исследования третичной структуры и свойств протеинов, нуклеиновых кислот и их комплексов. В этом методе в качестве спиновых меток используются нитроксильные радикалы и комплексы гадолиния радикалы. Относительно недавно было предложно использовать тритильные радикалы, преимуществом которых является возможность измерения относительно больших расстояний при низких температурах. Кроме того было показано, что тритильные радикалы можно использовать для измерения расстояний между метками до 6.5 нм при комнатных и физиологически важных температурах [1].

В докладе показаны возможности дипольной ЭПР спектроскопии для исследования структуры нуклеиновых кислот и их комплексов с протеинами на примере ряда исследований, выполненных в сотрудничестве трех институтов НИОХ СО РАН, МТЦ СО РАН, ИХБиФМ СО РАН. Исследование конформационных изменений ДНК с апуриновым/ ампиримидиновым сайтом или АР сайтом), который является наиболее распространенным повреждением ДНК, а также структуры комплекса ДНК с человеческой апириновой/ апуримидиновоый эндонуклеазой 1 с использование спиновых меток на основе тритильных радикалов [2]. Разработка новых спиновых меток на основе гидрофильного тритильного радикала ОХ063 с низкой токсичностью и не склонным к агрегации с альбумином и мембранах клеток. [3] Разработка спиновых меток на основе C_{60}. На примере ковалентно связанных пар C_{60} с тритильным радикалов (C_{60}-ТАМ) показана рекордная чувствительность и возможность измерения расстояний при комнатных температурах [4]. Применение новых высокостабильных спиновых меток на основе тетраэтилзамещенных пирролидиновых нитроксильных радикалов для исследования процессов с участием протеина RL2 в клетках [5].

1. *O. Krumkacheva, E. Bagryanskaya. Trityl radicals as spin labels, From the book: Electron Paramagnetic Resonance: Volume 25, 2016, 25, 35-60. ISSN:978-1-78262-857-6.*
2. *O.A. Krumkacheva, G.Shevelev, A.Lomzov, N.Dyrkheeva, A.A. Kuzhelev, V.V. Koval, V.M. Tormyshev, I. Kirilyuk, M. Fedin, D. Pyshnyi, O. Lavrik, E.G. Bagryanskaya. NAR, 2019, in press.*
3. *V.M. Tormyshev, O.A. Krumkacheva, A.Chubarov, D.V.Trukhin, O.Yu.Rogozhnikova, A. Spitsina, A.A. Kuzhelev, V.V. Koval, M.Fedin, T. Godovikova, M. Bowman, E.G. Bagryanskaya. Chem. Eur. Jour. 2019, submitted.*
4. *O.A. Krumkacheva, I.O. Timofeev, L.V. Politanskaya, E.V. Tretyakov, O. Yu. Rogozhnikova, D.V. Trukhin, A. Chubarov, E.G. Bagryanskaya and M.V. Fedin, Angwante, 2019, submitted.*
5. *O. Chinak, A. Shernuykov, V.M. Tormyshev, I. Kirilyuk, V.Rikhter, E.G. Bagryanskaya. J. Phys. Chem. C, 2019, submitted.*

Исследования выполнены при поддержке гранта Министерства образования и науки, грант 14.W03.31.0034 и грант РФФИ № 18-04-0038.

Структурные исследования механизма действия протективного химерного антитела против вируса клещевого энцефалита

Байков И.К.[1], Хойновски Г.[2], Матвеев А.Л.[1], Моор Н.А.[1], Емельянова Л.А.[1], Ламзин В.[2], Тикунова Н.В.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*
[2] *Европейская молекулярно-биологическая лаборатория, Гамбург, Германия*

Structural insights into the mechanism of action of protective chimeric antibody against tick-borne encephalitis virus

Baykov I.K.[1], Chojnowski G.[2], Matveev A.L.[1], Moor N.A.[1], Emelynova L.A.[1], Lamzin V.[2], Tikunova N.V.[1]

[1] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*
[2] *European Molecular Bioiogy Laboratory, Hamburg, Germany*

Ранее в ИХБФМ СО РАН было разработано химерное антитело ch14D5 против вируса клещевого энцефалита, обладающее высокой вируснейтрализующей и протективной активностью. Вместе с тем, механизм противовирусной активности этого антитела пока не изучен. В данном исследовании методом рентгеноструктурного анализа в сочетании с другими методами установлен эпитоп, узнаваемый протективным химерным антителом ch14D5 на поверхности гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита. Идентификация эпитопа позволила сформулировать основной механизм потивовирусного действия данного антитела. Сравнение с известными структурами двух других антител против вируса клещевого энцефалита показало существенные различия в ориентации Fab-фрагментов антитела относительно поверхности вириона, что может влиять на возможность блокирования выхода нуклеокапсида вируса в цитоплазму клетки.

Данное исследование было выполнено при поддержке проекта РНФ 17-74-10146, исследование взаимодействия антитела с белками D3 различных субтипов ВКЭ выполнено при поддержке гранта Президента РФ, проект № МК-6575.2018.4.

Новые ингибиторы Tdp1 – потенциальные антираковые препараты, как задача для структурной биологии

Волчо К.П.[1], Лузина О.А.[1], Захаренко А.Л.[2], Хоменко Т.М.[1], Саломатина О.В.[1], Суслов Е.В.[1], Захарова О.Д.[2], Рейниссон Й.[3], Лаврик О.И.[2], Салахутдинов Н.Ф.[1]

[1] *Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*
[3] *School of Pharmacy, Keele University, United Kingdom*

Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) является важным ферментом системы репарации ДНК [1]. Tdp1 играет ключевую роль в удалении повреждений ДНК, возникающих в результате действия ингибиторов топоизомеразы 1 (Topo1), клинически важных противоопухолевых агентов, снижая эффективность их действия. Таким образом, совместное применение противоопухолевых препаратов, особенно нацеленных на ингибирование Topo1, и ингибиторов Tdp1 может значительно повысить эффективность антираковой терапии.

Нами проведены систематические исследования по направленному дизайну ингибиторов Tdp1 на основе природных соединений различных структурных типов, включая монотерпеноиды, холевые кислоты и усниновую кислоту. В результате, в каждом типе производных природных соединений нами обнаружен целый ряд новых ингибиторов Tdp1, в том числе и превосходящих по активности все опубликованные ранее ингибиторы. Впервые продемонстрирована способность найденных ингибиторов Tdp1 многократно усиливать цитотоксичность ингибиторов Topo1 в отношении опухолевых линий клеток и, что особенно важно, усиливать противоопухолевое и антиметастатическое действие топотекана, клинически используемого ингибитора Topo1, в экспериментах *in vivo* [1,2]. Таким образом, найдены высокоэффективные ингибиторы фермента Tdp1, высокоперспективные для применения в комплексной терапии онкологических заболеваний.

В то же время, дальнейшее совершенствование ингибиторов Tdp1 сдерживается отсутствием действительно надежной структурной информации об особенностях связывания найденных низкомолекулярных ингибиторов с мишенью. Ожидается, что получение подобных данных позволит существенно повысить скорость разработки новых поколений ингибиторов Tdp1.

1. *Zakharenko A.L., Luzina O.A., Sokolov D.N., Kaledin V.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Patel J., Zakharova O.D., Chepanova A.A., Zafar A., Reynisson J., Leung E., Leung I.K.H., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. Novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors enhance the therapeutic impact of topotecan on in vivo tumor models. // Eur. J. Med. Chem. -2019. – V. 161. - P. 581-593.*
2. *Mozhaitsev E.S., Zakharenko A.L., Suslov E.V., Korchagina D.V., Zakharova O.D., Vasil' eva I.A., Chepanova A.A., Black E., Patel J., Chand R., Reynisson J., Leung I.K.H., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. Novel Inhibitors of DNA Repair Enzyme TDP1 Combining Monoterpenoid and Adamantane Fragments. Anti-Cancer Agents in Med. Chem., - 2019. – Vol. 19. - P. 463-472.*

Исследование поддержано грантом РНФ № 19-13-00040.

AP-эндонуклеаза 1 – многофункциональный фермент репарации ДНК

Дырхеева Н.С., Лаврик О.И.

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

Апуриновые/апиримидиновые (АР-) сайты возникают в ДНК путем спонтанного гидролиза N-гликозидной связи и при удалении поврежденного основания ДНК-гликозилазами. АР-сайты являются преобладающими некодирующими повреждениями ДНК, угрозой стабильности генома. Процесс исправления повреждений ДНК осуществляется путем координации различных белковых факторов в ходе этого процесса. Основным ферментом, репарирующим АР-сайты в ДНК клеток человека, является АР-эндонуклеаза 1 (APE1) – многофункциональный фермент, главной функцией которого является расщепление в ходе реакции гидролиза фосфодиэфирного остова ДНК с 5'-стороны от АР-сайта. Таким образом APE1 инициирует процесс эксцизионной репарации оснований ДНК (DNA base excision repair – BER) [1]. В результате этой реакции в ДНК образуется одноцепочечный разрыв с 3'-OH группой и 5'-дезоксирибозофосфатом (dRp) на концах разрыва. Такой одноцепочечный разрыв – промежуточное звено репарации ДНК, потенциально цитотоксичен. Далее он репарируется другими белками-участниками системы репарации, которые восстанавливают потерянное «звено» цепи и целостность ДНК. Помимо АР-эндонуклеазной активности, APE1 так же обладает 3'-фосфодиэстеразной, 3'-фосфатазной и 3'–5'-экзонуклеазной активностями [1]. Экзонуклеазная активность APE1 проявляется на ДНК-субстратах с модифицированными аналогами dNMP и с dNMP с неканонически спаренными основаниями на 3'-конце одноцепочечного разрыва ДНК, благодаря этому APE1 может выполнять в BER роль «корректора» ошибок, допущенных ДНК-полимеразой β. Известно, что APE1 использует один активный сайт для связывания с ДНК при проявлении этих двух активностей, АР-эндонуклеазной и 3'–5'-экзонуклеазной. В докладе будут рассмотрены структурно-функциональные аспекты проявления APE1 этих двух ферментативных активностей. Активный центр этого небольшого (Mw~35,5 кДа) ДНК-связывающего белка довольно компактный. За последнее время было опубликовано несколько работ [2,3] по структурам комплексов APE1 с различными ДНК-субстратами, в том числе с субстратом экзонуклеазной реакции, полученных с помощью рентгеноструктурного анализа. Будет рассмотрено, как фермент размещает в активном центре различные ДНК-субстраты в оптимальном для нуклеофильной атаки положении.

1. *Dyrkheeva N.S., Lebedeva N.A., Lavrik O.I., AP Endonuclease 1 as a key enzyme in repair of apurinic/apyrimidinic sites. Biochemistry (Mosc). 2016, 81, 951-67.*
2. *Freudenthal B.D., Beard W.A., Cuneo M.J., Dyrkheeva N.S., Wilson S.H. Capturing snapshots of APE1 processing DNA damage. Nat Struct Mol Biol. 2015, 22, 924-31.*
3. *Whitaker A.M., Freudenthal B.D. APE1: A skilled nucleic acid surgeon. DNA Repair (Amst). 2018, 71, 93-100.*

Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-00925.

Порядок и беспорядок в структуре ферментов репарации ДНК

Жарков Д.О.[1,2]

[1] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Репарация ДНК — основной процесс, защищающий генетический материал клетки от повреждения и присутствующий в том или ином виде во всех организмах. Из нескольких существующих путей репарации эксцизионная репарация оснований (ЭРО) удаляет из ДНК небольшие повреждения, незначительно искажающие структуру ДНК; модифицированные основания такого рода служат основным источником мутаций, а также участвуют в эпигенетической регуляции. Имеющиеся структурные данные показывают, что многие эукариотические ферменты ЭРО состоят из одного или нескольких упорядоченных коровых доменов, ответственных за связывание ДНК и катализ, и неупорядоченных фрагментов, длина которых может быть сравнима с длиной коровых доменов. Бактериальные гомологи эукариотических ферментов ЭРО чаще всего компактны, фактически представляя собой лишь коровые домены. Функции неупорядоченных фрагментов у эукариотических ферментов остаются в основном неясными. Были проанализированы доступные последовательности неупорядоченных фрагментов и коровых доменов ферментов тимин-ДНК-гликозилазы (TDG) и метилсвязывающего белка 4 (MBD4), которые участвуют в процессе активного эпигенетического деметилирования, гомологов эндонуклеазы VIII — ферментов репарации окисленных оснований, и апурин-апиримидиновой эндонуклеазы (APEX1), которая, кроме своей роли в репарации ДНК, участвует в реактивации окисленных факторов транскрипции. Поиск скрытых паттернов выявил, что в неупорядоченных фрагментах, в отличие от основных доменов, высока доля дивергентных повторов, и что эти фрагменты действительно обладают более гибкой структурой. Был предложен способ реконструкции вероятных метастабильных конформаций неупорядоченных фрагментов при помощи комбинации фолдинга *in silico* и жесткого белок-белкового докинга. С его помощью была проведена реконструкция белка APEX1 человека и предложен механизм его олигомеризации на ДНК. Предположительно основной функцией неупорядоченных фрагментов может быть не дополнительная стабилизация ДНК-белковых комплексов, как считалось ранее, а динамические белок-белковые взаимодействия, связанные с процессом жидкостного расслоения в наномасштабах.

Исследование поддержано грантом РНФ № 17-14-01190.

Возможности решения задач структурной биологии на российских источниках синхротронного излучения: статус и перспективы

Зубавичус Я.В.*

Институт катализа СО РАН

Структурная биология – одно из наиболее востребованных и динамично развивающихся направлений использования синхротронного излучения в мире. К рентгеновским методам, позволяющим извлекать структурную информацию необходимую для понимания функционирования живых систем, можно отнести белковую кристаллографию и малоугловое рассеяние.

В настоящий момент на территории РФ действует два синхротронных центра: на базе ИЯФ СО РАН в Новосибирске (накопительные кольца ВЭПП-3 и ВЭПП-4М) и на базе НИЦ «Курчатовский институт» в Москве (накопительное кольцо СИБИРЬ-2, спроектированное и построенное специалистами ИЯФ СО РАН). На синхротронных источниках в ИЯФ СО РАН работы в области структурной биологии проводились в режиме тестовых единичных измерений. На Курчатовском источнике синхротронного излучения специализированная станция белковой кристаллографии «БЕЛОК» работает в пользовательском режиме с 2007 года [1], а в 2018 году была запущена специализированная станция «БИОМУР» по определению размеров и формы белковых молекул в растворах методом малоуглового рассеяния (станция собрана из элементов выведенной из эксплуатации установки X33 Европейской молекулярно-биологической лаборатории, долгое время работавшей на синхротронном источнике DORIS в Гамбурге). В докладе представлены возможности данных двух установок с примерами недавних исследований, а также кратко описана инфраструктура ресурсного центра молекулярной и клеточной биологии «Молбиотех» (http://rc.nrcki.ru/pages/main/molbiotech/facilities/index.shtml) по наработке, очистке и роботизированной кристаллизации белков.

Совершенно очевидно, что существующих на сегодняшний день возможностей проведения исследований в области структурной биологии на оборудовании российских синхротронных источников катастрофически не хватает. В рамках проекта ЦКП «СКИФ» установкам, реализующим методики структурной биологии, отводится одна из приоритетных ролей. Синхротронный источник 4-го поколения «СКИФ» позволит генерировать рекордные по яркости рентгеновские пучки субмикронного сечения, обладающие высокой степенью пространственной когерентности, что позволит не только исследовать очень мелкие кристаллы биологических макромолекул и резко сократить среднее время эксперимента, но и реализовать последние инновационные методики, такие как серийная кристаллография и когерентный дифракционный имиджинг. В составе шести станций первой очереди ЦКП «СКИФ» задачи структурной биологии будут решаться на секциях 1-1-2 «Белковая кристаллография» и 1-2-4 «Малоугловое рассеяние». В рамках реализации этапа дооснащения ЦКП «СКИФ» в составе станций второй очереди планируется построить специализированную станцию структурной вирусологии совместно с ФГУБ ГНЦ ВБ «Вектор», а также несколько станций, реализующих расширенный функционал белковой кристаллографии, в частности, с возможностью использования метода MAD для расшифровки белковых структур.

1. D.M. Kheiker, et al. Crystallography Reports, 2007, Vol. 52, No. 2, pp. 358–364.

* *E-mail: yvz@catalysis.ru*

Структурный анализ механизмов активации внешнего сигнального пути программируемой клеточной гибели CD95

Иванисенко Н.В.[1,2], Иванисенко В.А.[1], Лаврик И.Н.[2,3]

[1] *ФИЦ ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *НГУ, Новосибирск, Россия*
[3] *Translational Inflammation Research, Medical Faculty, Otto von Guericke University, Magdeburg, Germany*

Существует два типа активации апоптоза: внутренний митохондриальный путь и внешний сигнальный путь, происходящий через активацию рецепторов смерти (РС). На сегодняшний день известно шесть РС: CD95/Fas, TNF-R1, TRAILR1/2, DR3 и DR6, в то время как CD95/Fas является одним из наиболее изученных членов семейства РС. Индукция апоптоза через CD95 во многov контролируется через образование сигнального комплекса, индуцирующего клеточную гибель (Death-Inducing Signaling Complex, DISC), который формируется при стимуляции CD95. Активация комплекса DISC происходит в результате олигомеризации белков CD95, адапторного белка FADD, прокаспазы-8/10 и c-FLIP. Нарушение сигнального пути CD95 ассоциировано с развитием множества опухолевых и нейродегенеративных заболеваний. Молекулярные механизмы сборки комплекса DISC до сих пор остаются не до конца изученными. В частности, на сегодняшний день разработанно лишь ограниченное число низкомолекулярных агентов, направленных на регуляцию данного сигнального пути. В данной работе с использованием методов структурного моделирования, методов системной биологии и экспериментального анализа были разработаны новые подходы воздействия на ключевые стадии сборки комплекса DISC с использованием рационально-сконструированных низкомолекулярных соединений и пептидов. Полученные соединения являются основой для разработки лекарственных препаратов, направленных на лечение патологий, ассоциированных с нарушением клеточной гибели.

Исследование поддержано бюджетным финансированием по проекту «Генетические основы биотехнологий и биоинформатика» (№ 0324-2019-0040), грантами РНФ № 14-44-00011 и РФФИ № 18-04-00352.

Структурные основы субстратной специфичности апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы человека APE1 в процессе инцизионной репарации нуклеотидов

Кузнецова А.А.[1], Матвеева А.Г.[2,3], Милов А.Д.[2], Воробьев Ю.Н.[1], Дзюба С.А.[2,3], Федорова О.С.[1,3], Кузнецов Н.А.[1,3]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт химической кинетики и горения СО РАН, Новосибирск, Россия*
[3] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Основной биологической функцией апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы человека APE1 является гидролиз фосфодиэфирной связи с 5′-стороны от AP-сайтов в процессе эксцизионной репарации оснований ДНК. Однако в ряде работ было показано, что фермент способен узнавать в качестве субстратов не только AP-сайты, но и некоторые поврежденные нуклеотиды, например 5,6-дигидроуридин, альфа-аномер аденозина, 1,N6-этеноаденозин и другие. Кроме того, фермент APE1 обладает 3′-фосфодиэстеразной, 3′-5′-экзонуклеазной, 3′-фосфатазной и эндорибонуклеазной активностями. Несмотря на интенсивное изучение функциональных особенностей фермента APE1 в настоящее время остается неизвестно, каким образом активный центр фермента способен узнавать значительно отличающиеся по своей природе и структуре поврежденные 2′-дезоксирибонуклеотиды и неповрежденные рибонуклеотиды.

В рамках данной работы для определения механизма широкой субстратной специфичности APE1 использовали метод двойного электрон-электронного резонанса, который позволяет рассчитать расстояние между двумя спиновыми метками в составе модельных ДНК-дуплексов. Анализ конформационных превращений фермент-субстратных комплексов в процессе узнавания поврежденного нуклеотида также был проведен в режиме реального времени с помощью метода остановленного потока.

Полученные данные свидетельствуют о том, что образование фермент-субстратного комплекса приводит к заметному изгибу дуплекса ДНК и угол изгиба зависит от типа поврежденного нуклеотида. С помощью молекулярно-динамического моделирования было показано, что в фермент-субстратном комплексе поврежденный нуклеотид, вывернутый из спирали ДНК, располагается в полости фермента, образованной остатками Asn-174, Asn-212, Asn-229, Ala-230, Phe-266 и Trp-280. При этом данные аминокислотные остатки не образуют специфических контактов с поврежденными нуклеотидами.

Таким образом, можно заключить, что способность поврежденного нуклеотида выворачиваться из двойной спирали и располагаться в данной полости фермента в ответ на образование неспецифических контактов в ДНК-связывающем центре, может быть ключевым фактором, обеспечивающим субстратную специфичность APE1.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - докторов наук МД-3775.2019.4. Предстационарный кинетический анализ выполнен при поддержке гранта РНФ № 18-14-00135.

Роль поли(АДФ-рибозо)-полимераз в стабильности генома, канцерогенезе и старении

Лаврик О.И.[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Поли(ADP-рибозил)ирование белков, катализируемое PARP1, является важнейшим процессом у высших эукариот, регулирующим ремоделирование хроматина, репарацию, репликацию и транскрипцию ДНК. При взаимодействии с поврежденной ДНК PARP1 катализирует синтез разветвленного полимера – поли(ADP-рибозы) (PAR). PAR может быть присоединен к акцепторным аминокислотным остаткам ядерных белков или самому PARP1. Этот процесс приводит к реорганизации хроматина и функциональных белковых комплексов, участвующих в эксцизионной репарации оснований (BER) или нуклеотидов (NER) [1]. Механизмы репарации ДНК относятся к числу основных стратегий, обеспечивающих сохранение целостности генома в процессе жизнедеятельности клетки. Геномная нестабильность ассоциирована со старением и с рядом патофизиологических состояний, например, онкогенезом. В докладе будут представлены результаты исследования роли поли(ADP-рибозил)ирования в регуляции BER и NER и поиска новых мишеней PAR-илирования, катализируемого PARP1 и PARP2. Установлена ключевая роль PARP1 и поли(ADP- рибозы) неструктурированных РНК-связывающих белков FUS и YB-1 в образовании специфических структур, концентрирующих поврежденную ДНК и белки репарации, что обеспечивает эффективность процессов репарации ДНК в структуре хроматина [2,3]. Исследованы активности BER, NER и PARP1 в клетках долгоживущего организма – голого землекопа (Heterocephalus glaber, H. glaber) в сравнении с клетками мыши. PARP1 и PARP2 регулируют процессы BER и NER. Уровень синтеза поли(ADP-рибозы) выше в клетках H. glaber по сравнению с клетками мыши, также как и экстракты клеток H. glaber имеют более высокий уровень экспрессии и активности PARP1, что может свидетельствовать в пользу вклада PARP1 в механизмы старения [4]. Центральная роль PARP1 в регуляции путей репарации ДНК у высших организмов делает этот белок перспективной мишенью для развития ингибиторов процессов репарации ДНК в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов и при лечении нейродегенеративных заболеваний.

1. *Alemasova E.E., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins. Nucleic Acids Res., 2019.*
2. *Alemasova E.E., Naumenko K.N., Kurgina T.A., Anarbaev R.O., Lavrik O.I. The multifunctional protein YB-1 potentiates PARP1 activity and decreases the efficiency of PARP1 inhibitors. Oncotarget. 2018, 9, 23349-23365.*
3. *Singatulina A., et al. PARP-1 Activation Directs FUS to DNA Damage Sites to Form PARG-Reversible Compartments Enriched in Damaged DNA. Cell Rep., 2019, 27, 1809-1821.*
4. *Evdokimov A., et al. Naked mole rat cells display more efficient excision repair than mouse cells. Aging. 2018, 10, 1454-1473.*

Работа поддержана грантом РНФ (19-14-00107).

Транскриптомные технологии для создания и изучения пептидных препаратов, обладающих нейропротекторными свойствами

Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Россия, Москва

В настоящее время важной областью разработки лекарств является использование соединений на основе природных регуляторных пептидов. Они оказывают направленное воздействие на организм и не оказывают токсического воздействия. Исследование особенностей экспрессии генов под действием пептидных препаратов позволяет детально определить особенности их влияния на клеточные функции и метаболические системы. Транскриптомный анализ, проведенный с помощью технологии RNA-seq, был использован для определения действия пептидных препаратов на клетки головного мозга в условиях модели экспериментальной ишемии, наиболее приближенной к острому ишемическому инсульту. Обнаружены широкомасштабные изменения экспрессии генов, в том числе тех, которые относятся к процессам нейротрансмиссии и воспаления. В целом был выявлен компенсаторный эффект пептидов, который противоположен действию ишемии на геномную активность. Таким образом, транскриптомный анализ показал важное влияние регуляторных пептидных препаратов на клеточный метаболизм, что может определить их положительное влияние на лечение соответствующих заболеваний. Обсуждается модель, объясняющая массированное действие пептидов на многочисленные клеточные функции и метаболические пути. Изучение транскриптомного профиля клеток мозга и его изменения под действием пептидов в условиях экспериментальной ишемии позволяет сформулировать основные принципы механизмов пептидной регуляции, и на основе этого определить новые подходы для дальнейшей разработки препаратов направленного нейропротекторного воздействия.

Исследование поддержано грантами РНФ 19-14-00268 и РФФИ КОМФИ №17-00-00104.

Молекулярно-динамические подходы к изучению взаимосвязи структуры и свойств производных нуклеиновых кислот

Ломзов А.А., Пышный Д.В.
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Методы компьютерного моделирования все более широко применятся для изучения свойств и молекулярных механизмов взаимодействия биополимеров. Это происходит благодаря значительному прогрессу в разработке алгоритмов моделирования и увеличению производительности вычислительных комплексов. Изучение биополимеров методами компьютерного моделирования позволяет в деталях изучить молекулярные механизмы наблюдаемых процессов. Нами проведено исследование ДНКДНК, РНК/ДНК и РНК/РНК комплексов, содержащих разнообразные модификации на конце олигонуклеотидов, во внутренней их части (введенных с помощью ненуклеотидных линкеров между частями олигомеров или присоединенных к гетероциклическим основаниям), модифицированные фосфатные группы, а так же замещенный остов. Проведенный анализ показывает высокую достоверность современных молекулярно-динамических подходов для описания структуры, конформационной динамики и термодинамических свойств комплексов нуклеиновых кислот. Полученные результаты хорошо согласуются с данными разнообразных физико-химических исследований, таких как оптическая спектроскопия, спектрополяримерия, флуоресцентная спектроскопия, методы ЯМР и ЭПР спектроскопии, атомно-силовая микроскопия, термическая денатурация.

Стоит отметить возрастающую прогностическую способность методов компьютерного моделирования. Так, на примере олигонуклеотидов, содержащих фосфорилгуанидиновую модификацию одного из межнуклеотидных остатков фосфорной кислоты, был осуществлен рациональный дизайн ДНК дуплекса, который должен позволить однозначно идентифицировать ФГ-диастереомеры олигодезоксирибонуклеотидов. Экспериментальный анализ методами структурного ЯМР показал достоверность предсказанных данных.

Изучение белково-нуклеиновых взаимодействий является более сложной задачей. Тем не менее, методы молекулярной динамики позволяют характеризовать структуру комплексов и объяснять наблюдаемые изменения в каталитической активности ферментов. Компьютерное исследование комплекса ДНК с экзонуклеазой APE1, содержащего в своей структуре спиновые метки, показало хорошее согласование структуры ДНК, белка и их комплекса с данными, полученными методами ЭПР-спектроскопии. Исследования комплексов фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов с Taq ДНК-полимеразой позволило установить причины изменения активности фермента, при удлинении модифицированной НК-цепи.

Таким образом, на сегодняшний день, молекулярно-динамические подходы стали не только методами описательного характера, но и достоверного прогностического расчета различных физико-химических и молекулярно-биологических свойств биополимеров.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 18-14-00357 и проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210021-7.

Зависимость эффективности удаления повреждений ДНК в составе кластера от их взаимного расположения

Лукьянчикова Н.В., Петрусева И.О., Ломзов А.А., Лаврик О.И.

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

Эксцизионная Репарация Нуклеотидов — один из важнейших путей репарации ДНК в клетках высших эукариот. Этот процесс обеспечивает удаление широкого спектра повреждений, вызывающих значительные нарушения регулярной структуры ДНК, таких как объемные химические модификации и УФ-повреждения. Возникновение кластеров из двух и более повреждений в пределах одного или двух витков спирали ДНК может приводить к затруднению процесса репарации [1]. Для изучения взаимодействий белков ЭРН с ДНК, содержащими объемное повреждение в составе кластера с АР-сайтом в одной или обеих цепях дуплекса, были выбраны модельные повреждения: ненуклеозидная вставка, содержащая остаток флуоресцеина (nFlu, N-[6-(дипивалоил-5(6)-флуоресцеинил-карбамоил)гексаноил]-O1-(4,4'-диметокситритил)-O2-[(диизопропил-амино)(2-циано-этокси)фосфино]-3-амино-1,2-пропандиол) и вставка на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля (DEG), аналог АР-сайта [2].

Сродство к ДНК сенсора объемных повреждений ХРС несколько повышалось, если расстояние между повреждениями в противоположных цепях было меньше 6 п.н. В то же время, уровень ЭРН-катализируемой специфической эксцизии nFlu-содержащего фрагмента был резко снижен, если повреждения в противоположных цепях разделяло менее 4 п.н. При расположении DEG и nFlu в одной цепи на расстоянии 5 нт эксцизия nFlu-содержащего фрагмента происходила так же эффективно, как в случае одиночного повреждения.

Полученные данные в совокупности с результатами выполненного компьютерного моделирования ДНК, содержащих модельные повреждения DEG и nFlu, позволяют проанализировать процесс репарации кластерных повреждений ДНК в клетках млекопитающих и оценить зависимость скорости удаления объемного повреждения в составе кластера от структуры и взаимного расположения повреждений.

1. *Georgakilas A., O'Neill P., Stewart R. Induction and repair of clustered DNA lesions: what do we know so far? // Radiat Res. - 2013. - 180(1), p. 100-9.*
2. *Kutuzov M., Ilina E., Sukhanova M., Pyshnaya I., Pyshnyi D., др. всего 7 человек. Interaction of Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 with Apurinic/Apyrimidinic Sites within Clustered DNA Damage // Biochemistry (Moscow). - 2011. - V.76 (1), p. 147-156.*

Исследование было выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-04-00018.

Комплексы белков-участников эксцизионной репарации оснований ДНК и их роль в координации процесса

Моор Н.А., Васильева И.А., Анарбаев Р.О., Лаврик О.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Эксцизионная репарация оснований (Base Excision Repair, BER) обеспечивает исправление самых многочисленных повреждений ДНК – модифицированных оснований, апуриновых/апиримидиновых сайтов и одноцепочечных разрывов. Действия ферментов, катализирующих последовательные стадии ЭРО, координируются их взаимодействиями друг с другом и с регуляторными белками. Нами исследованы взаимодействия апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы 1 (APE1), ДНК-полимеразы β (Polβ), тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (TDP1), белка XRCC1 и поли(ADP-рибоза) полимеразы 1 (PARP1) методами флуоресцентного титрования и FRET [1]. Определены равновесные константы диссоциации для четырнадцати комплексов, часть из которых зарегистрирована впервые, что позволило сравнить относительное сродство белков к партнерам. Зарегистрированы тройные комплексы, сформированные белками или белками и модельными ДНК, имитирующими интермедиаты BER. Сродство белков друг к другу и структура комплексов модулируются ДНК в различной степени, в зависимости от типа комплекса и ДНК-интермедиата. Измерения гидродинамических радиусов белков методом динамического светорассеяния указывают на то, что все белки существуют в виде гомодимеров; PARP1 образует с разными белками гетеротетрамеры, а XRCC1 – гетеродимеры или гетеротетрамеры [2]. Стабильность комплексов исследована с помощью метода гель-хроматографии с детекцией мульти-углового лазерного светорассеяния (SEC-MALLS). XRCC1 и Polβ образуют самый прочный комплекс, который может функционировать как устойчивая часть мультибелкового ансамбля в процессе BER и обеспечивать эффективную репарацию. Результаты исследований указывают на возможные механизмы регуляции и координации BER посредством изменения взаимного сродства белков в разных функциональных комплексах.

Чтобы понять функции BER как мультибелкового ансамбля, ассоциированного с хроматином, необходимо изучение структурной организации этих комплексов. Пока с помощью рентгеноструктурного анализа установлена трехмерная структура отдельных доменов белка XRCC1 в комплексах с соответствующими доменами трех ферментов – Polβ, LigIIIα и PNKP. Нами впервые закристаллизован полноразмерный белок XRCC1 и комплекс ферментов APE1 и Polβ.

1. *Moor N.A., Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Antson A.A., Lavrik O.I. Quantitative characterization of protein-protein complexes involved in base excision DNA repair. // Nucleic Acids Res. - 2015. - V. 43. - P 6009–6022.*
2. *Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Moor N.A., Lavrik O.I. Dynamic light scattering study of base excision DNA repair proteins and their complexes. // BBA - Proteins and Proteomics. - 2019. - V. 1867. - P 297–305.*

Исследование поддержано грантами РНФ 14-24-00038 и 19-14-00107.

XPD геликаза: лупа для объемных повреждений ДНК

Петрусева И.О.[1], Купер Й.[2], Каппенбергер Ж.[2], Лукьянчикова Н.В.[1], Кискер К.[2], Лаврик О.И.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН Новосибирск, Россия*
[2] *Центр экспериментальной медицины им. Рудольфа Вирхова, Университет г. Вюрцбурга, Германия*

Эффективная работа систем репарации ДНК - критически важная функция клетки, необходимая для поддержания стабильности генома. Скорость элиминации объемных повреждений системой эксцизионной репарации нуклеотидов (ЭРН) в клетках эукариот в значительной степени определяется эффективностью их распознавания. Распознавание объемных повреждений осуществляет АТР-зависимая 5'→3'геликаза XPD, субъединица фактора TFIIH, при стимулирующем действии p44. Остановка XPD при контакте с объемным повреждением делает его видимым для белков, участвующих в последующем репаративном процессинге. Структурные основы механизма работы hXPD в ЭРН пока не вполне ясны, их детальное изучение поможет понять, как химическая и пространственная структура повреждения связаны с эффективностью его удаления. Решение этой задачи имеет фундаментальное значение, а также важно в контексте сохранения индуцированных цитотоксических повреждений и поиска ингибиторов ЭРН.

Представления о механизме и структуре hXPD основаны на результатах биохимических исследований, сравнительного мутагенеза, и, в значительной степени, исследований кристаллов более доступных архейных белков-аналогов XPD и их комплексов с ДНК. Геликазы архей содержат все необходимые для проявления ДНК-геликазной активности домены, однако работают как изолированные мономеры, что ограничивает возможности их использования как функциональных аналогов hXPD.

Белок-аналог из Chaetomium thermophilum, ctXPD доступен в количествах, необходимых для рентгеноструктурных исследований и, подобно hXPD, функционирует в составе комплексов осуществляя специфические белок-белковые взаимодействия, способные влиять на настройку работы XPD как «лупы для объемных повреждений» [1].

Мы проанализировали узнавание рекомбинантной ctXPD и димера ctXPD/p44 ДНК, содержащих повреждения nFlu-, nAnt- и Fap-dC, эффективность удаления системой ЭРН и влияние на структуру ДНК которых мы изучили ранее [2, 3].

Резкое снижение геликазной и возрастание АТР-азной активности ctXPD/p44 при взаимодействии с ДНК, содержащими объемные повреждения, и повышенное сродство ctXPD к таким ДНК, указывают на сходство механизмов верификации объемных повреждений геликазами ctXPD и hXPD.

Полученные данные говорят о перспективности использования выбранной нами модельной системы в дальнейших биохимических и структурных исследованиях механизма верификации.

1. Kuper J., Braun C., Elias A. et al.// PLoS Biol. 2014. V. 12 № 9. P. 1-13.
2. Evdokimov A., Petruseva I., Tsidulko A. et al.// Nucleic Acids Res. 2013. V. 41. № 12. P. 1-10.
3. Evdokimov A., Tsidulko A., Popov A. et al.// DNA repair. 2018. V. 41. № 61. P. 86-98.

Финансирование работы осуществлялось за счет средств гранта РФФИ № 19-04-00018.

Структурно-функциональные исследования белков теломеразы

Польшаков В.И.[1], Петрова О.А.[2], Манцызов А.Б.[1], Марьясина С.С.[1,2], Родина Е.В.[2], Малявко А.Н.[2], Шепелев Н.М.[2], Ефимов С.В.[3], Зацепин Т.С.[4], Зверева М. Э.[2], Донцова О.А.[1,4]

[1] *Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия*
[2] *Химический факультет, МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия*
[3] *Институт физики, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*
[4] *Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия*

Теломераза представляет собой мультисубъединичный рибонуклеопротеиновый комплекс, ответственный за поддержание целостности генома в клетках эукариот. Механизм действия этого фермента представляет фундаментальный интерес. Теломераза является важной фармакологической мишенью, поскольку бессмертие раковых клеток связано с экспрессией в них этого фермента, в отличие от большинства соматических клеток организма. Однако структура и молекулярный механизм действия теломеразы все еще недостаточно исследованы. Функция фермента основана на динамическом взаимодействии каталитической субъединицы (TERT) с теломеразной РНК (TER), теломерными участками ДНК и несколькими белками, входящими в состав рибонуклеопротеинового комплекса. В состав теломеразы дрожжей кроме TERT и TER входят регуляторные белковые субъединицы Est1 и Est3, необходимые для нормального функционирования фермента *in vivo*.

В работе методом спектроскопии ЯМР исследованы N-концевой (TEN) домен TERT и субъединица Est3 из термотолерантных дрожжей *Hansenula polymorpha*. Выполнено практически полное отнесение химических сдвигов сигналов обоих белков [1,2]. Определены структуры высокого разрешения этих белков в растворе и исследованы их динамические свойства. Изучены взаимодействия TEN-домена и Est3 с фрагментами РНК и ДНК, моделирующими вероятное окружение этих белков в теломеразе дрожжей. Полученные результаты позволяют предполагать, что TEN домен контролирует ограничение размера гетеродуплекса ДНК-РНК во время синтеза повторов теломер [3]. Установлено, что Est3 участвует в формировании теломеразы посредством взаимодействия с Est1.

1. *Polshakov V., Petrova O., Parfenova Yu., Efimov S., Klochkov V., Zvereva M., Dontsova O. NMR assignments of the N-terminal domain of Ogataea polymorpha telomerase reverse transcriptase. // Biomol. NMR Assign.- 2016.- V.10. - P 183–187.*
2. *Mariasina S., Efimov S., Petrova O., Rodina E., Malyavko A., Zvereva M., Klochkov V., Dontsova O., Polshakov V. Chemical shift assignments and the secondary structure of the Est3 telomerase subunit in the yeast Hansenula polymorpha. // Biomol. NMR Assign.- 2018.- V. 12.- P 57–62.*
3. *Petrova O., Mantsyzov A., Rodina E., Efimov S., др. всего 16 человек. Structure and function of the N-terminal domain of the yeast telomerase reverse transcriptase. // Nucleic Acids Res.- V. 46.- P 1525–1540.*

Исследование поддержано грантами РНФ № 14-14-00598 и 19-14-00115.

Организационный статус проекта ЦКП «СКИФ»

Ракшун Я.В.*

Институт ядерной физики СО РАН, Институт катализа СО РАН

Центр коллективного пользования «Сибирский кольцевой источник фотонов» (ЦКП «СКИФ») – один из крупнейших за последние десятилетия проектов, нацеленных на модернизацию исследовательской инфраструктуры в России. Основаниями для реализации данного проекта являются:

- Указ Президента Российской Федерации от 01.12.2016 № 642 «О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации» (п. 21, п. 30 г, п.32, п. 39 б, п. 45).
- Поручение Президента Российской Федерации В.В. Путина от 18 апреля 2018 года п. 1б. и п. 4.
- Указ Президента Российской Федерации от 07.05.2018№ 204 «О национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года».
- Распоряжения Правительства Российской Федерации от 01.12.2018 №2659-р об утверждении Плана комплексного развития Сибирского отделения Российской академии наук с учётом приоритетов и долгосрочных планов развития Сибирского федерального округа.

К моменту запуска, запланированному на 2024 год, ЦКП «СКИФ» станет лучшим в своем классе источником синхротронного излучения, характеризующимся минимальным эмиттансом и максимальной степенью когерентности среди машин среднего энергетического диапазона (3 ГэВ). В состав исследовательской инфраструктуры ЦКП «СКИФ» на первом этапе реализации проекта войдут шесть станций, использующих излучение ондуляторов и вигглеров из прямолинейных промежутков накопительного кольца: 1-1 «Микрофокус», 1-2 «Структурная диагностика», 1-3 «Быстропротекающие процессы», 1-4 «XAFS-спектроскопия и магнитный дихроизм», 1-5 «Диагностика в высокоэнергетическом диапазоне» и 1-6 «Электронная структура». Это позволит в кратчайшие сроки приступить к реализации амбициозной программы мультидисциплинарных научных исследований.

Финансирование проекта предусмотрено в рамках Национального проекта «Наука» в объеме 37,1 млрд. руб. в ценах текущих лет (2019-2024). Реализацией проекта занимается консорциум исследовательских институтов СО РАН и ВУЗов Сибирского региона; в качестве координаторов работ по созданию ускорительного комплекса и исследовательской инфраструктуры выступают Институт ядерной физики СО РАН и Институт катализа СО РАН, соответственно. Руководящим органом проекта является Научно-координационный совет под председательством Акад. РАН В.И. Бухтиярова.

В докладе представлена актуальная информация о плане-графике реализации проекта и его текущем статусе. Подробно описаны вызовы, стоящие перед проектным коллективом, такие как обеспечение высокой степени локализации производства технологического оборудования на территории Новосибирской области, привлечение предприятий реального сектора экономики к реализации проекта в качестве партнеров и пользователей, подготовка научных и инженерных кадров высокой квалификации.

* *E-mail: ya.v.rakshun@inp.nsk.su*

Структурная организация активного центра примитивных биокатализаторов

Смирнов И.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова

Биокаталитическая функция – это одна из наиболее совершенных функций свойственных живым системам. Биокаталитическая активность находит широкое применение в различных сферах современной промышленной и фармацевтической биотехнологии. Эта функция реализуется в ограниченном наборе биологических объектов, основная доля из которых приходится на белковые молекулы – ферменты и антитела. В настоящее время описано большое количество антител с различными типами каталитической активности, как к низкомолекулярным химическим соединениям, так и к биополимерам. В настоящем исследовании представлены результаты сочетания теоретических и экспериментальных подходов, направленных на индукцию новой каталитической функции у антител, исследование структуры образующегося активного центра и определения молекулярных механизмов биокаталитической реакции. Приведены новые подходы для направленного изменения функциональных свойств биокатализаторов, на основе широкомасштабных компьютерных расчетов – метод «виртуального созревания антител» и микрофлюидный метод высокопроизводительного скрининга биокаталитической активности. Использование этих технологий позволило получить панель антител, способных метаболизировать пестицид параоксон, и модифицированного фермента бутирилхолинэстеразы, способной его гидролизовать. Проведенный анализ структурный анализ, полученных биокатализаторов позволит лучше понять особенности формирования активного центра, что в свою очередь приведет к созданию биокатализаторов с заранее заданными функциональными активностями.

Исследование было поддержано грантом РФФИ ЕМБЛ_т18-54-74006.

ПОСТЕРНАЯ СЕССИЯ

Molecular dynamics pipeline for predicting the effects of cancer-associated amino acid substitutions: Identification of new OGG1 somatic variants with low activity

Popov A.V.[1,2], Endutkin A.V.[1,2], Barmatov A.E.[1], Makasheva K.A.[2], Yatsenko D.D.[2], Raspopova D.Yu.[2], Zharkov D.O.[1,2]

[1] *SB RAS Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia*
[2] *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

Progress in modern sequencing methods has allowed increasingly personalized antitumor therapy. To enhance the power of personalization, data on the functionality of tumor-associated variants of proteins involved in the response to DNA damage are of considerable interest. Particular attention today is paid to predictions of the functionality of protein variants by computational methods. However, the vast majority of such methods are presently based on the phylogenetic information and barely use the modern possibilities of computational analysis of the structure and dynamics of proteins.

We have employed molecular dynamics simulation to model the structures of mutant variants, observed in clinical tumor samples, of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1), a protein belonging to the base excision repair system. This enzyme reduces the cytotoxicity of several classes of anticancer drugs, including thiotepa, bleomycin, cisplatin, etc. The enzymatic activity of these mutant variants has been determined in parallel.

We have developed a software pipeline to automate the retrieval and preparation of many similar structures differing only by amino acid substitutions, for feeding into molecular dynamics simulation programs. Trajectories of a random sample of mutant variants of OGG1 were obtained. The predicted functionality of all known mutant OGG1 variants found in human cancers was classified according to the results of four algorithms using only phylogenetic information (SIFT, FATHMM, MutationTaster and PROVEAN), and compared with the classification of OGG1 mutants based on the results of molecular dynamics. We have purified a series of mutant OGG1 proteins and characterized them biochemically, establishing that OGG1 I145M and R161W variants found in esophageal squamous cell carcinoma and colon adenocarcinoma, respectively, have a significantly reduced enzymatic activity. Within the set of 11 experimentally characterized mutant variants, molecular dynamics analysis showed a better correlation with experimental results than did predictions by phylogenetic methods.

This study was supported by RSF (grant 18-74-00052).

Excimer forming pyrene probes for detection of RNA and point mutations in RNA

Semikolenova O.A.[1], Kim B.H.[2], Venyaminova A.G.[3], Novopashina D.S.[1,3]

[1] *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*
[2] *Pohang University of Science and Technology (POSTECH), Pohang , Korea*
[3] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*

Design of new fluorescent probes for nucleic acids detection and point mutations determination is the actual direction of modern bioorganic chemistry and molecular biology. In spite of the serious progress in the design of fluorescent probes there are no probes satisfy for the complex of all necessary requirements. The ideal fluorescent probe must be highly stable for exo- and endo-nucleases digestion, has a good affinity to NA targets and considerable sensitivity of fluorescence upon binding with target. Pyrene modified oligonucleotide probes capable to form excimers are prospective instruments for RNA and DNA detection due to their high sensitivity to the microenviroment.

The aim of our work is the design of excimer forming oligonucleotide probes on the basis of pyrene bearing oligo(2′-O-methylribonucleotides) and demonstration of their applicability for RNA detection and point mutation determination.

MicroRNAs particularly microRNA let-7 are considered as diagnostics biomarkers and are the objects of investigation upon creation of new improved systems of RNA detection. The series of 5′-bispyrene probes and tandem probes bearing two pyrene residues on the components junction were synthesized using two different methods. The first method is a newly developed solid-phase synthesis based on the 5′-hydroxyl group of immobilized oligo(2′-O-methylribonucleotide) activation by N,N′-disuccinimidyl carbonate and subsequent interaction with pyrenemethylamine. The second method is based on the activation of 5′-phosphate of deprotected oligo(2′-O-methylribonucleotide) in solution followed by interaction with pyrenemethylamine. The most sensitive fluorescent probes were revealed using the comparative study of their fluorescent properties upon hybridization with synthetic microRNA let-7a target. The possibility of point mutation detection using 5′-bispyrene probes was demonstrated using fully matched RNA and mismatched RNA containing one point mutation. The strong dependence of sensitivity of point mutation detection on nucleotide context was demonstrated.

Proposed excimer forming pyrene modified oligo(2′-O-methylribonucleotides) can by efficiently used for RNAs detection and point mutations determination.

The work was partially supported by Russian State funded budget project of ICBFM SB RAS # AAAA-A17-117020210021-7.

Microbial production of recombinant RNAs for therapy and environmental control

Stepanov V.G.[1,2], Liu Y.[2,3], Willson R.C.[2], Karpova G.G.[1], Fox G.E.[2]

[1] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia*
[2] *University of Houston, Houston, USA*
[3] *Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, China*

Recent advances in RNA research create a demand for cost-effective production of RNA aptamers, antisense oligoribonucleotides, ribozymes, and other RNAs of practical importance. As of now, the majority of RNAs are made by either automated multistep chemical synthesis or enzymatic template-directed polymerization. Unfortunately, a sustained large scale RNA production by any of these methods remains too expensive to justify RNA use for anything else than selected medical applications where it can generate sufficient revenue to cover high manufacturing costs.

Hereby we present an integrated approach to cost-effective RNA production based on expression of recombinant RNAs in an appropriate bacterial host. Our method combines (1) a bacterial strain with genome-encoded phage RNA polymerase, (2) a plasmid vector which harbors an artificial RNA expression unit transcribed by the phage RNA polymerase to a processable RNA scaffold fused with the RNA of interest, (3) a cell cultivation procedure which relies on selective stimulation of the phage RNA polymerase-transcribed gene expression to achieve high yields of the RNA chimera, and (4) a high-throughput RNA isolation and purification protocol with minimum reliance on expensive equipment and toxic chemicals. Two tested RNA scaffolds were derived from small stable RNAs, *Vibrio proteolyticus* 5S rRNA and peptidyl transferase domain of *Thermus thermophilus* 23S rRNA. Each scaffold plays a dual role as a recognition element for the host enzymes which convert the primary transcript into mature RNA, and as a protective module that reduces polyadenylation and exoribonuclease trimming of the processed RNA and may provide some degree of protection against endoribonucleases by hindering their access to the inserted cargo RNA. Increased intracellular accumulation of the recombinant RNA chimera is achieved by selective suppression of the host RNA, DNA and protein synthesis using appropriate antibiotics added in mid-log phase of culture growth. After cell harvesting, RNA is isolated using neutral non-toxic lysis solution containing urea, SDS and EDTA as major acting agents. Purification of the recombinant RNA proceeds through fractional precipitation with CaCl2 and ethanol, and selective RNA capture by aggregated denatured lysozyme. Finally, the RNA chimera is either cleaved to release the inserted RNA cargo or left intact if it is compatible with functionality of the cargo.

The approach was successfully applied to the production of shRNAs, and is considered for the production of anti-viral and anti-bacterial aptamers and ribozymes, anti-thrombotic aptamers, and shRNA-based nematocides.

EPR studies of complexes of photosensitizers with albumin promising in photodynamic therapy of cancer

Timofeev I.O.[1], Spitsina A.S.[2], Lebedeva N.Sh.[3], Koifman O.I.[3], Chubarov A.S.[4], Fedin M.V.[1], Bagraynskaya E.G.[2], Krumkacheva O.A.[1]

[1] *International Tomography Center SB RAS, Russia*
[2] *N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Russia*
[3] *G. A. Krestov Institute of Solution Chemistry, Russia*
[4] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS*

Many photosensitizers promising for photodynamic therapy are lipophilic substances with low solubility in water. Therefore, the effective delivery of such photosensitizers requires the use of special transport systems. Human serum albumin (HSA) is a natural transport protein with multiple ligand binding sites, making it a promising carrier for the delivery of lipophilic drugs. HSA is able to bind with some photosensitizers with high efficiency and to accumulate in malignant and inflamed tissues. Photophysical properties of photosensitizers bound to HSA depend on its localization at the protein. In order to create new efficient agents for photodynamic treatment it is necessary to investigate the structure of such complexes.

In this paper, we for the first time applied various methods of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy to study complexes of human serum albumin (HSA) with porphyrin derivatives. As a result, we obtained the distribution functions for the distances between the photoexcited triplet of photosensitizers and the nitroxyl radical selectively introduced at HSA. This allowed us to establish binding sites on HSA for various porphyrins. We estimated also the accessibility of the photosensitizer triplet to solvent molecules in complex with protein. In addition, the effect of binding to HSA on the singlet oxygen generation efficiency and on the distribution of the electron spin density in the porphyrin triplet molecules was evaluated.

It was shown that tetra (hydroxyphenyl) porphyrin forms a complex with HSA in two binding sites located in domains IIa and IIIa. In these sites, porphyrin has practically no access to solvent molecules, but demonstrates effective production of singlet oxygen. In contrast to this, EPR methods have showed binding of cationic porphyrin (5,10,15,20-tetrakis (4-N-methylpyridyl porphyrin) mainly in one site in domain 1B of HSA, in which porphyrin is highly accessible to solvent molecules. The significant decrease in the efficiency of singlet oxygen generation is observed for this porphyrin in complex with HSA, despite the fact that according to EPR data the formation of a complex does not affect the quantum yield of the triplet state and the structure of porphyrin.

The work was supported by the RSF № 18-73-00292

New DNA glycosylases from the helix--two-turn--helix superfamily: Structures and biochemical characterization

Yudkina A.V.[1,2], Naumenko M.B.[2], Garcia-Diaz M.[3], Zharkov D.O.[1,2]

[1] *SB RAS Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia*
[2] *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*
[3] *Stony Brook University, Stony Brook, NY, USA*

DNA glycosylases are enzymes that maintain the genome integrity, representing a key element of the base excision DNA repair system. Due to their ability to recognize base lesions created by deamination, ionizing radiation, alkylating and oxidizing agents, these enzymes are still a subject of acute interest. DNA glycosylases are divided into several unrelated structural superfamilies, one of which, the helix–two-turn–helix (H2TH) superfamily, consists of enzymes acting on a variety of oxidized purines and pyrimidines. Eight families within the H2TH superfamily were known until recently: Fpg, Nei, NEIL1, NEIL3, NEIL3, MMH, AcNei1 and AcNei2, named after their representative members that had been extensively studied. Recently, whole-genome sequencing revealed four groups of new H2TH members present in some bacterial species. Importantly, these new enzymes show differences from the existing representatives of the H2TH superfamily in several critical regions responsible for DNA binding, damaged base eversion and recognition. In this work we have cloned and investigated two such enzymes, which we term Flp (Fpg-Like Proteins): Flp1 from *Streptomyces coelicolor* and Flp3b from *Bacteroides thetaiotaomicron*. We have used an optimized protocol of protein expression and purification to obtain these enzymes in an active form. Both enzymes preferentially cleaved DNA containing oxidized pyrimidines (5-hydroxyuracil and dihydrouracil) and abasic sites, and were unable to remove oxidized purines (8-oxoguanine, 8-oxoadenine), deaminated bases (uracil, hypoxanthine), and epigenetically modified bases (5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine). Both Flp1 and Flp3b, unlike many other DNA glycosylases, were also active on single-stranded DNA, and had no opposite-base preference. We have crystallized and solved the structure of Flp3b at 2.0 Å resolution. It had an atypical N-terminal catalytic residue (Lys instead of Pro in most other H2TH enzymes) and demonstrated significant deviation from known structures of Fpg, Nei, and NEIL1 in several loops that specifically interact with damaged DNA. Overall, Flp proteins appear to be redundant for oxidative damage repair, since the respective genomes also encode "typical" H2TH enzymes. We speculate that, despite their ability to excise damaged pyrimidines, Flp proteins may have evolved in response to unique genotoxic challenges, such as DNA-damaging secondary metabolites, faced by some bacteria in their native environment.

This study was supported by RFBR (grant 17-04-01761-a).

Механизмы развития аутоиммунных заболеваний

Невинский Г.А., Аулова К.С., Урусов А.Е.

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

Рассеянный склероз (РС) известен как воспалительное и демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы. Экспериментальные мыши C57BL/6, склонные к спонтанному развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ), известны как модель рассеянного склероза у человека.

Нами показано, что при спонтанном развитии ЭАЭ и иммунизации мышей C57BL/6 с помощью MOG35-55 (фрагмент мышиного белка миелина), комплексов ДНК с гистонами и метилированным бычьим сывороточным альбумином (мет-БСА) происходит изменение профилей дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и в зависимости от антигена возрастание или понижение уровня пролиферации лимфоцитов в различных органах (мозг, тимус, селезенка и лимфатические узлы). Эти процессы приводят к развитию ЭАЭ и ассоциированы с наработкой аутоантител против основного белка миелина (ОБМ), MOG, гистонов, ДНК и абзимов, гидролизующих эти субстраты. Проведено сравнение изменения указанных выше параметров при спонтанном и ускоренном ЭАЭ мышей после их иммунизации с помощью MOG, комплексов ДНК-гистоны и ДНК-мет-БСА. Иммунизация мышей всеми тремя антигенами ускоряет развитие ЭАЭ, но в каждом случае наблюдаются разные специфические изменения профилей дифференцировки ГСК. При этом при иммунизации мышей разными антигенами обнаружены как положительные (от +0,13 до +0,91), так и отрицательные (от -0,09 до -0,98) корреляции между титрами аутоантител против ДНК, MOG и гистонов с относительной активностью абзимов, гидролизующих эти субстраты. Обработка эмышей с помощью MOG35-55 приводит к появлению острой фазы ЭАЭ в 7-20 дней после иммунизации. В отличие от MOG, иммунизация комплексом гистонов с ДНК ведет к подавлению протеинурии, значительному увеличению титров антител против ДНК, ОБМ, MOG, а также их каталитической активности в гидролизе этих антигенов. По сравнению с MOG, острая фаза ЭАЭ в случае комплексов ДНК-гистоны и ДНК-мет-БСА достигается позже; образование антител против ДНК и абзимов гидролизующих ДНК наблюдается с большой задержкой (15-20 дней). Данные указывают на то, что для мышей C57BL/6 различные комплексы ДНК с белками демонстрируют антагонистические эффекты по сравнению с MOG. ДНК-гистоны стимулируют появление гистонов-гидролизующих абзимов в острой фазе ЭАЭ, в то время как с активностью ДНКазы только в значительно более поздний период.

Впервые показано, что в зависимости от антигена в разные периоды развития ЭАЭ (начало (7 днуй), острая фаза (18-20 дней) и ремиссия (25-63 дня) у мышей относительные количества вредных для них аутоантител с низкой и высокой каталитической активностью, а также без таковой значительно различаются. Показано, что профили дифференцировки ГСК у мышей склонных к СКВ (MRL-lpr/lpr) и ЭАЭ (C57BL/6) при развитии этих патологий очень похожие.

1. *Doronin V.B., Parkhomenko T.A., Korablev A., et. al. Changes in different parameters, lymphocyte proliferation and hematopoietic progenitor colony formation in EAE mice treated with myelin oligodendrocyte glycoprotein. J Cell Mol Med. 2016; 20: 81–94.*
2. *Aulova K.S., Toporkova L.B., Lopatnikova J.A., et.al. Changes in haematopoietic progenitor colony differentiation and proliferation and the production of different abzymes in EAE mice treated with DNA. J Cell Mol Med. 2017; 21: 3795-3809.*

3 Doronin V.B., Korablev A., Toporkova L.B. et. al. Changes in several disease parameters including abzymes and hematopoietic progenitor colony formation in brain inflammation and demyelination. J Neurology Neurol Disorders, 2017, 3 (2).
4. Aulova K.S., Toporkova L.B., Lopatnikova J.A., et al. Changes in haematopoietic progenitor colony differentiation and proliferation and the production of different abzymes in EAE mice treated with DNA. J Cell Mol Med. 2017 Dec;21(12):3795-3809

Работа поддержана грантами РНФ № 16-04-00609 и № 19-15-00145.

Идентификация полисахаридных рецепторов бактериофагов методом молекулярного серотипирования клебсиелл

Бабкин И.В., Морозова В.В., Тикунов А.Ю., Фофанов М.В., Козлова Ю.Н., Бардашева А.В., Тикунова Н.В.

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

Klebsiella pneumoniae – это второй после *Escherichia coli* по распространенности в мире патоген, ассоциированный с большим спектром инфекционных заболеваний. Инфекции, вызванные клиническими изолятами клебсиелл с множественной устойчивостью к антибиотикам, связаны с высоким уровнем смертности. При этом резистентность к противомикробным препаратам в большей степени распространена среди внутрибольничных штаммов клебсиелл. В настоящее время клебсиелла является главным патогеном, связанным с распространением генов устойчивости к антибиотикам при помощи горизонтальной передачи генов.

Одним из факторов патогенности клебсиелл являются полисахаридные капсулы, покрывающие клетку и повышающие вирулентность клебсиеллы. Гипервирулентные штаммы продуцируют гиперкапсулу и известны как гипермукоидные штаммы. Капсулы состоят из штаммоспецифичных капсульных полисахаридов, называемых К-антигенами. К-антиген традиционно определялся серологическими методами. Но в последние годы был выявлен оперон *cps* бактериальной хромосомы, необходимый для синтеза капсулы. Было показано, что типирование штаммов по К-антигенам может осуществляться при помощи секвенирования по локусу *wzi* оперона cps.

В коллекции ИХБФМ депонированы штаммы клебсиелл различного происхождения, а также изолированные и охарактеризованные по спектру бактерий-хозяев клебсиельные бактериофаги. Штаммы клебсиелл были идентифицированы по последовательностям генов 16S рРНК и *rpoB*. Использование этого метода позволяет точно определить вид и род бактерий. Большинство последовательностей были отнесены к *Klebsiella pneumoniae*. Штамм 2487 был отнесен к *Klebsiella oxytoca*, штамм 1756 относится к *Klebsiella quasipneumoniae*.

Далее было проведено генотипирование штаммов по последовательности гена *wzi*. На основании результатов филогенетического анализа последовательностей гена *wzi* штаммам были присвоены капсулярные серотипы. Значительное количество штаммов клебсиелл было отнесено к гипервирулентным серотипам К1 и К2, при этом было выявлено большое разнообразие серотипов клебсиелл в коллекции ИХБФМ. Было показано, что бактериофаги КР192 и КР194 специфичны к серотипу К2, а КР184 – к серотипу К1, показана специфичность 9 бактериофагов к различным серотипам клебсиелл.

Исследование выявило штаммы имеющие значительные отличия от известных серотипов клебсиелл, что позволяет предположить наличие новых, ранее не описанных серотипов в коллекции ИХБФМ.

Работа выполнена при поддержке Фонда РФФИ, проект № 18-29-08015 «Разработка способов создания геномов искусственных бактериофагов для контроля патогенных бактерий».

Исследование вирома мелких млекопитающих, обитающих в лесопарковых зонах г. Новосибирска

Бабкин И.В.[1], Тикунов А.Ю.[1], Ткачев С.Е.[1], Панов В.В.[2], Кабилов М.Р.[1], Тикунова Н.В.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия*

Известно, что мелкие грызуны являются основным резервуаром различных зоонозных инфекций. В работе проведено изучение кишечных виромов широко распространенных видов полевок – красной полевки и полёвки-экономки методом массового параллельного секвенирования и выявлены последовательности ДНК и РНК-содержащих вирусов.

Основная доля изученных вирусных последовательностей представлена бактериофагами; были обнаружены представители семейств *Myoviridae, Podoviridae* и Siphoviridae порядка *Caudovirales*, а также значительное количество последовательностей, отнесенное к семейству *Microviridae*. Установлены полные геномы 65 различных вирусов семейства *Microviridae*, около половины из них относятся к подсемейству *Gokushovirinae*, часть к подсемейству *Alpavirinae*, остальные к ранее неописанным ранее подсемействам семейства *Microviridae*. На основе анализа генной синтении и филогении предложены новые таксономические группы семейства *Microviridae*. В геноме двух неклассифицированных изученных бактериофагов был обнаружен ген пептидазы M15, ранее он был открыт в геномах некоторых gokushovirus и alpavirus. Впервые в геномах вирусов семейства *Microviridae* были найдены гены N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase и lytic transglycosylase, что свидетельствует о большом разнообразии генов лизинов в геномах этих вирусов. Это может быть объяснено широким распространением горизонтального переноса генов между этими вирусами и их бактериальными хозяевами.

Другая многочисленная группа исследованных вирусных последовательностей отнесена к различным семействам эукариотических CRESS вирусов млекопитающих, насекомых и растений. Определены полные геномы 14 различных CRESS вирусов. У разных грызунов выявлены высокогомологичные по нуклеотидной последовательности CRESS вирусов, отличающиеся только наличием делеций/инсерций. Большинство исследованных последовательностей CRESS вирусов уникальны, и возможно относятся к новым вирусным семействам. Остальные выявленные вирусные последовательности отнесены к семействам *Parvoviridae, Adenoviridae* и неклассифицированным представителям порядка *Picornavirales*. Все эти последовательности также значительно отличаются от известных вирусов. Можно заключить, что виром диких грызунов, обитающих вблизи человеческих поселений, требует дальнейшего изучения.

Влияние противоопухолевого пептида лактаптина на аутофагию в раковых клетках

Багаманшина А.В.[1], Троицкая О.С.[1], Юнусова А.Ю.[1], Лаврик И.Н.[2], Рихтер В.А.[1], Коваль О.А.[1,3]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Университет Отто фон Герике, Магдебург, Германия*
[3] *Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Ранее в нашей лаборатории из молока человека был выделен и охарактеризован белок лактаптин, который обладал апоптоз-индуцирующей активностью в отношении опухолевых клеток различного тканевого происхождения и помимо апоптоза также индуцировал молекулярные трансформации, характерные для аутофагии. Генно-инженерный аналог лактаптина (RL2) супрессировал рост и метастатическую активность опухолей у мышей без проявления токсических эффектов,

Аутофагия может способствовать как выживанию клетки в стрессовых условиях, так и стимулировать клеточную гибель. В работе для исследования возможности усиления цитотоксического эффекта лактаптина были использованы модуляторы аутофагии.

Методом электронной микроскопии было показано, что при обработке опухолевых клеток препаратом RL2 в комбинации с ингибитором аутофагии хлорокином (CQ) количество аутофагосом в клетке возрастало в два раза без реализации катаболического процесса. Также, подтверждено, что при обработке клеток RL2 происходит аутофагия-зависимый процессинг LC3. Показано, что в опухолевых клетках, обработанных RL2, уровень белка p62 снижался, в то время, как в клетках, обработанных RL2 в комбинации с ингибиторами аутофагии (CQ, 3MA, Ku55933) уровень p62 повышался, что свидетельствует об индукции аутофагии в клетках, обработанных RL2. Методом МТТ-анализа было показано, что использование ингибиторов аутофагии CQ, Ku55933 и индуктора рапамицина в комбинации с RL2 усиливало цитотоксический эффект in vitro. Следовательно, можно сделать вывод, что RL2 стимулирует аутофагию в обработанных опухолевых клетках, а действие ингибиторов или индукторов аутофагии в комбинации с RL2 усиливает цитотоксический эффект *in vitro*.

В экспериментах на мышах-опухоленосителях лимфосаркомы, устойчивой к цисплатину (RLS), было показано, что при внутривенных инъекциях RL2 (12 мг/кг) в комбинации с CQ (50 мг/кг) противоопухолевый эффект усиливался по сравнению с монотерапией. Продолжительность жизни у мышей, получавших комбинированную терапию RL2/CQ была выше в среднем на 40-50% по сравнению с группами животных, получавших монотерапию.

Исследование было поддержано грантом ПФНИ ГАН № #АААА-А17-117020210023-1, VolkswagenStiftung Grant #90315.

Использование масс-спектрометрического анализа для идентификации структурных белков потенциально терапевтических бактериофагов

Байков И.К.[1], Зеленцова Е.А.[2], Морозова В.В.[1], Ушакова Т.А.[1], Боковая О.В.[1], Фофанов М.В.[1], Тикунова Н.В.[1].

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

Baykov I.K.[1], Zelentsova E.A.[2], Morozova V.V.[1], Ushakova T.A.[1], Bokovaya O.V.[1], Fofanov M.V.[1], Tikunova N.V.[1].

[1] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*
[2] *International Tomography Center SB RAS, Novosibirsk, Russia*

При исследовании бактериофагов возникает необходимость установить функцию той или иной рамки считывания, полученной при секвенировании генома бактериофага. При отсутствии выраженной гомологии с известными последовательностями сделать это на основе одной лишь последовательности гена затруднительно. В случае структурных белков масс-спектрометрический анализ является мощным методом, который позволяет сопоставить фрагмент генома с белковым продуктом. В данной работе были проанализированы пять потенциально-терапевтических бактериофагов: PM85, PM135, KP8, KP179 и SA57, поражающих некоторые штаммы P. mirabilis, K. pneumoniae и S. aureus. Было установлено несколько белков, пропущенных при аннотации генома, в частности небольшой белок бактериофага PM135, предположительно являющийся декорирующим белком. Для некоторых рамок считывания на основе масс-спектрометрических данных была уточнена позиция стартового кодона. Ряд рамок считывания, не имеющих гомологии с известными последовательностями, был отнесен к генам структурных белков с неустановленной функцией. Анализ последовательности аминокислотных остатков некоторых структурных белков позволил установить ряд структурных особенностей.

Исследование было выполнено при поддержке проекта РФФИ 18-34-00636.

Роль абзимов в аутоиммунных процессах при ВИЧ-инфекции

Баранова С.В., Невинский Г.А.

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

При ВИЧ-инфекции в организме сначала нарабатываются антитела против белков вируса, а затем происходит специфический сбой иммунной системы, ведущий к развитию аутоиммунных реакций. Согласно сложившимся представлениям четким и ранним признаком протекания этих процессов является наличие в крови каталитически активных иммуноглобулинов. Известно, что абзимы с протеолитической активностью против разных белков обычно специфически гидролизуют только эти белки.

Патологический процесс при ВИЧ-инфекции затрагивает практически все органы и системы человека, но одним из основных очагов поражения является нервная система, в том числе, и характерное для данной инфекции поражение мозга – подострый энцефалит с участками демиелинизации. Основной белок миелина (ОБМ) играет важную роль в патогенезе рассеянного склероза. Гистоны – это белки, которые участвуют в упаковке нитей ДНК в ядре и регуляции ядерных процессов. Низкая концентрация гистонов ведет к повреждению ДНК, а в большом количестве гистоны токсичны для клетки. Показано, что 100% IgG из крови ВИЧ-инфицированных пациентов эффективно расщепляют от одного до пяти человеческих гистонов. Таким образом, абзимы против гистонов могут играть важную роль в патогенезе ВИЧ-инфекции и, вероятно, в развитии различных аутоиммунных процессов.

Показано, что IgG крови ВИЧ-инфицированных больных против гистонов и ОБМ, выделенные последовательно хроматографией на колонках с иммобилизованными субстратами, эффективно гидролизуют как гистон H1, так и ОБМ, но не другие контрольные белки. Используя масс-спектрометрию MALDI TOF, найдены сайты расщепления гистона H1 и ОБМ абзимами против этих белков. Сайты гидролиза H1 и ОБМ расположены в разных, но высоко гомологичных сайтах этих белков.

Анти-гистон и анти-ОБМ антитела крови ВИЧ-инфицированных больных являются первыми примерами абзимов, обладающих не только кросс-комплексообразованием, но и каталитической перекрестной реактивностью. Согласно литературным данным, в крови больных ВИЧ повышается концентрация гистонов, поэтому существование перекрестной реактивности абзимов против гистонов и ОБМ представляет большую опасность для человека. Они могут атаковать ОБМ миелиновой оболочки аксонов и играть отрицательную роль в патогенезе заболевания.

Работа поддержана грантом РНФ № 19-15-00145, Проектом ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210023-1.

CAR Т-клетки, экспрессирующие новый, полностью человеческий, CD20-специфичный химерный антигенный рецептор

Беловежец Т.Н.[1,2]

[1] *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Несмотря на широкий арсенал методов борьбы с онкогематологическими заболеваниями, терапевтический инструментарий для лечения пациентов с лейкозами и лимфомами достаточно ограничен, а долговременный прогноз выживаемости негативен.

Целью исследования было создание и изучение активности нового химерного антигенного рецептора (CAR) со специфичностью к CD20 и его сравнение с другими опубликованными CAR аналогичной специфичности.

Были сконструированы лентивирусные плазмиды, кодирующие CAR с антигенраспознающими доменами от CD20-специфических мышиных антител 1F5 и Leu16, а также высокоафинного человеческого антитела - офатомумаб (2F2). С использованием псевдотипированных лентивирусных частиц на основе данных плазмид были получены Т-клетки здорового донора, экспрессирующие различные варианты CAR против CD20. Нами показана специфическая цитотоксичность CAR Т-клеток против CD20+ CD19+ клеток-мишеней линии Raji на уровне, сравнимом с CD19-специфичным CAR на основе антитела FMC63. Также был изучен субпопуляционный состав полученных CAR Т-клеточных продуктов, поскольку известно, что коммитированные CAR Т-клетки хуже персистируют в организме. Используемая нами методика позволяет получать популяцию CAR Т-клеток с близким к исходному соотношению субпопуляций, что должно обеспечить поддержание ими долговременного противоопухолевого контроля в экспериментах *in vivo*.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 19-415-543015 р_мол_а.

Рекомбинантная дестабилаза может разрушать изопептидные связи в старых тромбах в условиях *in vitro*

Бобровский П.А., Манувера В.А., Лазарев В.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Россия, Москва

Существенным недостатком существующих используемых в настоящее время тромболитических лекарств является тот факт, что эффективность препаратов определяется «возрастом» тромба: чем старше тромб, тем труднее он поддается лизису протеиназами. В старых тромбах молекулы фибрина сшиты между собой поперечными изопептидными связями, которые образуются под действием фактора XIIIa. В данной работе мы исследуем растворение старых тромбов за счет разрушения изопептидных связей рекомбинантным ферментом дестабилазой. Дестабилаза является белком секрета слюнных желез медицинских пиявок. Она относится к лизоцимам i-типа и обладает мурамидазной и изопептидазной ферментативными активностями.

В работе использовали тромбы, извлеченные в ходе оперативного лечения пациентов. Тромбы высушивали, взвешивали и обрабатывали рекомбинантной дестабилазой в течение 24 часов. Затем их снова высушивали и взвешивали для определения изменения массы тромба. Было показано, что дестабилаза вызывает снижение массы тромба на 27,7% ± 1,8% по сравнению с контрольным буферным раствором (9,1% ± 0,6%) с уровнем значимости $p = 0{,}0134$. Далее, сухие тромбы инкубировали в 2% растворе уксусной кислоты и определяли степень дестабилизации тромбов путем оценки количества белково-пептидного материала, измерением поглощения при длине волны 280 нм. Было обнаружено, что тромбы, предварительно обработанные контрольным раствором, практически не растворились в 2% уксусной кислоте, в то время как тромбы, обработанные дестабилазой, полностью растворились. Сравнение оптической плотности 2% раствора уксусной кислоты, содержащего дестабилизированный фибрин остаточных тромбов показал значимое отличие от контрольного образца в 7 раз ($p = 0{,}0059$).

Предложенный подход позволяет оценить непосредственное влияние дестабилазы на уровень стабилизации фибрина в тромбе. Дестабилаза медицинской пиявки может служить тромболитическим агентом для более эффективного растворения старых тромбов, в дополнение к традиционным тромболитикам.

Авторы выражают благодарность Басковой И.П., а также Немировой С.В. за предоставленный биологический материал. Исследование было поддержано грантом РНФ № 17-75-20099.

Характеризация хвостовых белков бактериофагов *Proteus mirabilis* с целью создания бактериофага с расширенным спектром хозяев

Боковая О.В.[1,2], Морозова В.В.[1], Бабкин И.В.[1,2], Козлова Ю.Н.[1], Тикунова Н.В.[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский государственный национальный исследовательский университет, Новосибирск, Россия*

Proteus mirabilis – это грамм-отрицательный бактериальный патоген. Известно, что у некоторых штаммов рода *Proteus* возникает устойчивость к антибиотикам. Коктейли бактериофагов против лекарственно-устойчивых штаммов *Proteus mirabilis* могут быть использованы как биологическая альтернатива использованию антибиотиков. Однако использование бактериофагов для лечения бактериальных инфекций имеет свои недостатки. Зачастую бактериофаги обладают узким спектром бактерий-хозяев, что затрудняет их использование. Возможным выходом из этой ситуации является создание бактериофагов с расширенным спектром бактерий-хозяев.

Ранее в Лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН были выделены 5 литических бактериофагов, специфичных к некоторым штаммам патогенных бактерий *Proteus mirabilis*. Было проведено полногеномное секвенирование бактериофагов, и проведена аннотация геномов. Биоинформатический анализ показал, что в геномах фагов PM93 и PM85 содержится по две ОРТ, предположительно кодирующие хвостовые белки с потенциальной деполимеразной активностью. В геномах фагов PM16, PM116 и PM75 было найдено по одной ОРТ, кодирующей подобные белки. Для характеризации этих белков были получены генетические конструкции в плазмиде Pet28b+, содержащие последовательности соответствующих фаговых генов.

Пять генетических конструкций, кодирующих рекомбинантные хвостовые белки фагов PM93, PM85 и PM75 были получены. Индукция синтеза белка с полученных конструкций показала, что все белки присутствуют как в растворимой цитоплазматической фракции, так и в нерастворимой. Рекомбинантные белки были наработаны, и была произведена их хроматографическая очистка на колонке с сорбентом Ni-NTA. Удалось очистить четыре белка: P93GP46, P93GP47, P85GP47 и P75GP46. Проведены предварительные эксперименты на способность деградировать поверхностный полисахаридный матрикс хозяйских штаммов *Proteus mirabilis*. Показано, что рекомбинантные белки P93GP47 и P75GP4 обладают полисахарид-деградирующей активностью.

Работа выполнена при поддержке Фонда РФФИ, проект № 18-29-08015 «Разработка способов создания геномов искусственных бактериофагов для контроля патогенных бактерий».

Изменения социального поведения самцов мышей при вызванном колите

Борисова М.А.[1], Снытникова О.А.[2,3], Литвинова Е.А.[1,4], Ачасова К.М.[1,5], Пиндюрин А.В.[3,6], Центалович Ю.П.[2,3], Кожевникова Е.Н.[4,5,6]

[1] *Федеральный исследовательский центр Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск, Россия*
[3] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*
[4] *Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия*
[5] *Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, Новосибирск, Россия*
[6] *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия*

Хронический колит индуцировали с помощью поения самцов мышей 2% раствором декстрансульфата натрия (ДСС). Было исследовано влияние ДСС на социальное поведение самцов, метаболизм и кишечную микрофлору. Поскольку при потреблении ДСС наблюдается опустошение бокаловидных клеток кишки, была исследована возможность коррекции наблюдаемых изменений с помощью поения 0,1% раствором L-фукозы (терминального моносахарида муцина-2).

Поение самцов мышей ДСС привело к отсутствию предпочтения запаха самок запаху самцов в ольфакторном тесте. Самцы, потреблявшие ДСС, также демонстрировали атаки на самок в тесте с двумя интрудерами, чего не наблюдалось в поведении самцов контрольной группы (поение водой). Также у мышей группы «ДСС» наблюдались очаговые нарушения целостности эпителия кишки и инфильтрации воспалительных клеток, снижение количества триптофан-продуцирующих бактерий *E.coli* и *Bifidobacterium* в кишке и уровня триптофана в крови. Совместное поение ДСС и L-фукозой восстановило социальное поведение самцов в тесте на предпочтение запахов: самцы данной группы достоверно дольше обнюхивали образец запаха самок, чем образец запаха самцов. Также самцы группы «ДСС+L-фукоза» не демонстрировали атаки на самок, однако самцы группы «L-фукоза» атаковали самок так же часто, как и самцы группы «ДСС». Выраженность воспаления в кишке при совместном поении ДСС и L-фукозой не отличалась от уровня группы «ДСС», при этом количество триптофан-продуцирующих бактерий в кишке и уровень триптофана в крови по сравнению с группой «ДСС» увеличились.

Мы предполагаем, что L-фукоза способствует росту триптофан-продуцирующих бактерий, что приводит к увеличению содержания триптофана в крови. Увеличение уровня триптофана, возможно, повышает содержание серотонина в головном мозге, что в свою очередь может корректировать социальное поведение самцов мышей. Таким образом, изменения социального поведения самцов мышей возможно корректировать путем поения раствором L-фукозы.

Исследование было поддержано грантами РФФИ № 18-33-20097(в части метаболомного анализа) и № 18-315-00269 (исследование поведения животных и гистологии). Определение отдельных видов бактерий было поддержано из средств гранта РНФ № 18-74-00057. Лабораторные животные были приобретены при поддержке бюджетного проекта # 0324-2019-0041.

Самосборка дискретных ДНК-наноструктур на основе разветвленных конъюгатов олигонуклеотидов

Брылёв В.А.[1], Зацепин Т.С.[2], Устинов А.В.[1], Кокин Е.А.[1,3], Цветков В.Б.[4,5], Баринов Н.А.[5], Клинов Д.В.[5], Коршун В.А.[1]

[1] *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*
[2] *Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия*
[3] *Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
[4] *Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия*
[5] *Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия*

Способность комплементарных нуклеиновых кислот к образованию двухцепочечных фрагментов используется в ДНК-нанотехнологии для создания самоорганизующихся конструкций [1]. Использование определенных последовательностей в одноцепочечных олигонуклеотидах позволяет контролируемо проводить самосборку желаемых фрагментов в заранее заданной последовательности [2]. Таким образом, стало возможным создание высокомолекулярных ансамблей на основе нуклеиновых кислот. Первоначально, искусственные ДНК-наноструктуры синтезировались исключительно в фундаментальных целях для демонстрации применения ДНК в качестве «строительного материала» [3]. В настоящее время работы по созданию самоорганизующихся наноконструкций на основе нуклеиновых кислот всё чаще имеют прикладной характер [4]. При конструировании двумерных и трехмерных структур необходимо использовать сочленения, в которых могут пересекаться три или четыре дуплекса. Чаще всего такие сочленения делаются нековалентными [5].

Мы разработали ковалентное двухходовое сочленение и методики получения разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов, которые могут применяться в создании блоков для дальнейшей самосборки более сложных дискретных ДНК-наноструктур [6]. Из полученных V-образных блоков получены дискретные самоорганизующиеся структуры, изучено влияние условий гибридизации на получаемый набор продуктов. Также был проведен синтез несимметричных V-образных блоков и их гибридизация с образованием «наномономеров». Полученные дискретные «наномономеры» при смешивании образовывали новые более крупные дискретные конструкции.

1. Seeman N.C. Nature, 2003, 421, 6921, 427–431.
2. Chandrasekaran A.R. et al., Small, 2016, 12, 20, 2689–2700.
3. Seeman N.C., Sleiman H.F. Nat. Rev. Mat., 2018, 3, 1, 17068.
4. Li S.P. et al., Nature Biotechnol., 2018, 36, 3, 258–264.
5. Seeman N.C. J. Theor. Biol., 1982, 99, 2, 237–247
6. Ponomarenko A.I. et. al. Tetrahedron, 2016, 72, 19, 2386–2391.

Исследование было поддержано грантами РФФИ № 18-33-01271 и РНФ № 15-15-00053 (синтез разветвляющего реагента).

Протеомный анализ адгезивно-инвазивной *Escherichia coli*, ассоциированной с болезнью Крона

Букато О.Н., Побегуц О.В., Евсютина Д.В., Ракитина Д.В., Байкова Ю.П., Матюшкина Д.С., Ладыгина В.Г., Фисунов Г. Ю.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства», Москва, Россия

Болезнь Крона (БК) — это хроническое заболевание, которое характеризуется воспалением желудочно-кишечного тракта. Этиология БК еще не полностью выяснена. Многие штаммы БК-ассоциированной *E.coli* имеют адгезивно-инвазивный фенотип (АИКП). В нашем исследовании мы сосредоточились на выявлении протеомных изменений у АИКП, выделенных у пациентов с болезнью Крона. *In vitro* анализ бактериальной адгезии и инвазии проводился с использованием клеток эпителиальной колоректальной аденокарциномы человека Caco-2. В нашей работе мы использовали 12 штаммов *E.coli*. Для проведения сравнительного протеомного анализа БК-ассоциированной *E.coli*, которые обладают наиболее выраженными адгезивно-инвазивными свойствами в сравнении с контрольными изолятами *E.coli* были использованы методы 2D-дифференциального электрофореза и ВЭЖХ-МС.

В отличие от лабораторных штаммов *E.coli* и изолятов от здоровых людей, все БК-ассоциированные штаммы ярко демонстрировали адгезионно-инвазивные свойства на клеточной линии Caco-2. Наиболее представленными белками у БК-изолированных штаммов были белки классов мембранных поринов с различной специфичностью. Некоторые из них участвуют в активном транспорте низкомолекулярных молекул, а также в адгезии и инвазии. Так же было показано, что уровень белков, связанных с защитой клетки от окислительного и осмотического стресса, был повышен. В БК-ассоциированных *E.coli* активизировалась метаболическая система, участвующая в утилизации пропандиола.

Мы подтвердили, что БК-ассоциированные штаммы *E.coli* из нашей коллекции имеют адгезивно-инвазивный фенотип в отличие от *E.coli* изолированных от здоровых людей. Совместный протеомный анализ АИКП и контрольных штаммов *E.coli* выявил закономерности а изменения в представленности белков, участвующих в адаптации бактерий к агрессивной среде.

Работа поддержана грантом РНФ 16-15-00258.

Антитела-протеазы как маркеры нейродеструктивных процессов при заболеваниях различной этиологии

Бунева В.Н.[1], Паршукова Д.А.[2], Смирнова Л.П.[2], Невинский Г.А.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *НИИ психического здоровья «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия*

Антитела-протеазы – каталитически активные антитела, гидролизующие основной белок миелина (ОБМ), обнаружены при аутоиммунных заболеваниях: рассеянном склерозе (РС) и системной красной волчанке (СКВ), а также при ВИЧ-инфекции.

ОБМ – один из основных компонентов миелина ЦНС, а его гидролиз вызывает воспалительные процессы при РС и непосредственно влияет на нейрональную передачу сигнала. Следует отметить, что уровень антител (АТ) к ОБМ при шизофрении (ШЗ) значительно выше, чем у здоровых доноров.

Кроме иммунологических сбоев, указанные заболевания характеризуются нейродеструктивными процессами: неврологические и нейропсихические расстройства встречаются как при РС и ШЗ, так и при СКВ и на поздних стадиях ВИЧ-инфекции.

Изучение роли иммунологических нарушений, в том числе антител-протеаз, в патогенезе нейронального развития заболеваний различной этиологии является, несомненно, актуальным.

В работе исследован протеолиз ОБМ антителами-протеазами больных ШЗ в зависимости от клинических особенностей заболевания. Показано, что IgG гидролизуют ОБМ и его пептиды, доказано, что протеолитическая активность является собственным свойством АТ. Уровень протеолитической активности IgG при ШЗ выше активности АТ здоровых лиц и пациентов в ремиссии. Определены кинетические параметры и характер протеазной активности АТ. Активность ОБМ-гидролизующих IgG ассоциирована с клинико-нозологическими особенностями ШЗ: максимальная активность ОБМ-гидролизующих IgG выявлена при непрерывном типе течения параноидной ШЗ. АТ больных ШЗ с ведущей негативной симптоматикой демонстрируют повышение гидролиза ОБМ и его пептидов в 2 раза по сравнению с АТ больных с ведущей позитивной симптоматикой. Активность IgG, гидролизующих ОБМ, многократно возрастает с увеличением продолжительности болезни. По данным МРТ выявлено снижение плотности миелина у пациентов с ШЗ, которое наиболее выражено при ведущем негативном симптомокомплексе, что подтверждено отрицательной корреляцией между плотностью миелина и уровнем ОБМ-гидролизующей активности IgG.

Полученные результаты позволят внести вклад в понимание механизмов патогенеза шизофрении, а также процессов интеграции нервной и иммунной систем организма человека.

Кроме того, они создадут базу для разработки целенаправленной нейролептической терапии в комбинации (при необходимости) с иммуносупрессивными и противовоспалительными препаратами, что является важным шагом на пути к персонализированной и прецизионной медицине.

Исследование поддержано грантом РНФ № 19-15-00145.

Рекомбинантный фермент Cpf из бактерии *Moraxella bovis*

Васиховская В.А.[1], Романенко М.В.[1], Гончар Д.А.[2], Нетёсов С.В.[1]

[1] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*
[2] *ООО СибЭнзайм, Новосибирск, Россия*

Белок Cpf1 является компонентом системы CRISPR/Cas V типа и представляет собой адресуемую эндонуклеазу, используемую прокариотами для расщепления инвазивной ДНК. Использование компонентов системы CRISPR в клетках эукариот дает возможность с высокой точностью совершать такие генно-инженерные манипуляции как редактирование генома по пути гомологичной рекомбинации, нокаут генов по пути NHEJ, регуляция экспрессия генов и в перспективе применять их в терапевтических целях. Получение и изучение новых ферментов, таких как Cpf1, позволит расширить инструментарий для этих видов работ и поэтому представляет перспективную биотехнологическую задачу.

Целью данной работы являлось обнаружение гена *cpf1* в геноме бактерий рода *Moraxella* с последующим клонированием и экспрессией гена, выделением очищенного препарата Cpf1 и тестированием его активности.

На начальном этапе был проведен поиск последовательностей геномов для различных штаммов бактерий рода *Moraxella* в базе данных GenBank, среди них были отобраны и выровнены последовательности генов *cpf1*. На консервативный районы были подобраны праймеры для амплификации целевого гена. Последовательность начала и конца гена *cpf1* была установлена методом прогулки по хромосоме, основанном на эффекте супрессии ПЦР, для гена из штамма *Moraxella bovis*, его полная нуклеотидная последовательность была установлена секвенированием по Сэнгеру. Целевой ген был клонирован в составе экспрессирующего вектора pET15b по методу гомологичной рекомбинации при помощи системы In-Fusion. В полученной конструкции ген сцеплен с последовательностью, кодирующей гистидиновый олигопептид на N-конце белка. При поддержке компании «СибЭнзайм» был осуществлен подбор условий для экспрессии гена и очистка целевого белка при помощи ВЭЖХ.

Тестирование полученного препарата *in vitro* показало, что фермент Cpf1, несмотря на наличие гистидинового олигопептида, проявляет эндонуклеазную активность, причем полнота протекания гидролиза ДНК максимальна в буферном растворе с C_{NaCl} = 100 мМ, а pH в диапазоне 7,0–8,5 не влияет на степень конверсии. Также было установлено, что наличие в модельной ДНК последовательности TTTN в качестве PAM-сайта достаточно для эффективного протекания гидролиза.

Таким образом, был выделен препарат белка Cpf1 с доказанной эндонуклеазной активностью *in vitro*. Узнавание ферментом T-богатого PAM-сайта позволит расширить набор мишеней для геномного редактирования. Дальнейшее изучение свойств препарата и сравнение с коммерчески доступными препаратами Cpf1 из бактерий *Acidaminococcus* и *Lachnospiraceae* позволит усовершенствовать инструментарий для генно-инженерных манипуляций.

Авторы выражают благодарность коллективу компании «СибЭнзайм» за помощь в проведении экспериментов. Исследование было поддержано программой «УМНИК-2018».

Идентификация электрического заряда вирусоподобных частиц вируса Ласса, белка VP-40 вируса Эбола, моноклональных антител клещевого энцефалита с помощью КНИ – нанопроволочного биосенсора

Генералов В.М.[1], Наумова О.В[2], Фомин Б.И.[2], Сафатов А.С.1, Пьянков С.А.[1], Дурыманов А.Г.[1], Буряк Г.А.[1], Локтев В.Б.[1], Протопопова Е.В.[1], Щербаков Д.Н.[1], Асеев А.Л.[2]

[1] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Кольцово, Россия*
[2] *Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

Относительно недавно предложено использовать МОП транзистор (металл окисел полупроводник) в качестве биосенсора. Принцип работа транзистора основан на модуляции его проводимости в ответ на воздействие со стороны биологической суспензии на разделе фаз с поверхностью его затвора [1]. Цель настоящего исследования – установление знака электрического заряда, свойственного белку VP-40 – маркеру вируса Эбола, моноклональным антителам к вирусу клещевого энцефалита, вирусу гриппа H_3N_2 со специфическими антителами и для вирусоподобных частиц (ВПЧ) вируса Ласса с антителами 37.7 на разделе фаз с нанопроволкой КНИ транзистора.

В качестве биосенсоров в работе использовали n-канальные КНИ-нанопроволочные (КНИ-НП) транзисторы [2].

Анализ временных зависимостей тока стока транзистора, полученных до и после добавления на поверхность биосенсора анализируемых проб, позволил выявить следующие факты.

Белок VP-40 модулирует проводимость транзистора отрицательным зарядом.

Специфические моноклональные антитела в комплексе с белком VP-40 модулируют проводимость транзистора отрицательным зарядом.

Знак заряда для моноклональных антител к вирусу клещевого энцефалита также отрицательный.

Знак заряда вируса гриппа H_3N_2 со специфическими и неспецифическими антителами отрицательный.

Антитела против вируса Ласса в растворе 0,3 М сахарозы электронейтральны.

Знак заряда суспензия ВПЧ Ласса в растворе 0,3 М сахарозы положительный.

1. *Bergveld P. Development, operation, and application of ion-sensitive field-effect transistor as a tool for electrophysiology // IEEE Trans. Biomed. Eng. – 1972. – V. 19. – P 342–351.*
2. *Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Dudchenko N.V., Devyatova S. F., др., всего 10 человек. SOI nanowires as sensors for charge detection // Sem. Sci. Technol. – 2010. – V. 25. – Paper 055004.*

Исследование было поддержано госзаданием Роспотребнадзора ГЗ 11/16 и частично (в части, касающейся вируса Ласса) грантом РФФИ # 18-29-02091\18.

Бактериофаги группы T5 как потенциальные агенты фаготерапии: распознавание О-антигена энтеробактерий

Голомидова А.К.[1], Куликов Е.Е.[1], Морозова В.В.[2], Летаров А.В.[1]

1 ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия
2 ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Фаготерапия сегодня стала одним из перспективных видов терапии бактериальных инфекций, дополняя и в ряде случаев заменяя привычную антибиотикотерапию. Рациональная фаготерапия нового поколения требует глубокого исследования биологии терапевтических фагов и особенностей их взаимодействия с бактериями. Одной из групп вирулентных бактериофагов, соответствующих принятым нормам для фаговой терапии, являются фаги группы T5, обладающие активностью против широкого спектра практически значимых патогенов.

Ранее мы показали, что выделенные нами T5-подобные бактериофаги DT57C и DT571/2 осуществляют первичный и обратимый этап взаимодействия с поверхностью клетки за счет трёх разветвленных латеральных хвостовых фибрилл (LTF), выполняющих функцию распознавания поверхностного О-антигена (ОПС) клетки бактерии-хозяина. Эти фибриллы состоят из двух белков – LtfA и LtfB. Мишенями для LtfA являются О-полисахариды штаммов *E. coli* 4s – O22-подобные (для фага DT57C) или HS1/2 серотипа O87 (для фага DT571/2), а для LtfB – О-полисахарид серотипа O81 штамма HS3-104 (для обоих фагов). Эти данные хорошо отражают способность бактериофагов приспосабливаться к существованию в высокоплотных микробных сообществах за счёт расширения спектра хозяев фага с помощью модификаций боковых фибрилл, распознающих различные серотипы О-АГ. Основной задачей нашей работы было оценить вклад LTF в распознавание фагом различных серогрупп О-АГ энтеробактерий. Мы исследовали шесть выделенных нами T5-подобных фагов на способность инфицировать различные штаммы энтеробактерий. В результате работы было показано, что T5-подобные бактериофаги, даже не обладающие разветвленной L-образной фибриллой (например, фаги T5, Shivani, CF17 и Gostya9), способны распознавать различные серогруппы О-АГ энтеробактерий:

DT751/2 - 6 штаммов *E. coli* (O87, O81);
DT57C - 6 штаммов *E. coli* (O22, O81);
CF17- 1 штамм *E. coli*, 2 штамма *Citrobacter ssp.*;
Shivani - 1 штамм *Salmonella enterica*, 2 штамма *E. coli*;
T5 - 3 штамма *E. coli*;
Gostya9 – 1 штамм *E. coli* (O28).

Для большей части исследуемых штаммов энтеробактерий серогруппа О-АГ не была подтверждена ЯМР, однако у них были выделены ЛПС и проведена сравнительная характеристика их электрофоретической подвижности. На данный момент ведутся работы по определению их серотипов. Обнаруженная способность бактериофагов группы T5 распознавать широкий спектр О-АГ бактерий кишечной группы указывает на то, что от фагов этой группы можно ожидать высокой эффективности при фаготерапевтическом применении.

Работа поддержана грантом РНФ №15-15-00134.

Опухоль-адресующие пептиды, как средство разработки таргентых препаратов

Голота О.В., Войтова А.А., Дмитриева М.Д., Васильева Н.С., Дымова М. А., Кулигина Е.В., Рихтер В.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

Глиобластома – одна из самых агрессивных и распространенных опухолей головного мозга. Стандартное лечение, включающее хирургическую резекцию, лучевую и химиотерапию позволяет продлить жизнь до 14 месяцев. Наибольшей проблемой при лечении глиобластомы является отсутствие таргетного лечения. Цель данного исследования – получение опухоль – адресующих пептидов из комбинаторных фаговых пептидных библиотек, специфически связывающихся с клетками глиобластомы человека (U-87 MG) *in vitro* и *in vivo* в модели ксенографтов. Выбранные опухоль – специфические пептиды, могут быть использованы для конъюгации с различными противоопухолевыми препаратами, а также для таргетной доставки в составе липосом или наноконтейнеров.

Для отбора пептидов, специфически связывающихся с поверхностью клеток глиобластомы человека (U-87 MG), была использована технология фагового дисплея. Было проведено 5 раундов селекции комбинаторной фаговой библиотеки Ph.D.12 (New England Biolabs) на клетках U-87 MG *in vitro*. Отобрано 80 фагов, экспонирующих на своей поверхности 12-ти членные пептиды, нуклеотидные последовательности которых были отсеквенированы и проанализированы в программе MEGA-X. Уникальный пептид [SWTFGVQFALQH], был представлен в 24,3% случаев. Так же мы провели скрининг комбинаторной фаговой библиотеки Ph.D.7 (New England Biolabs) на опухоли глиобластомы человека (U-87 MG) в модели ксенографтов *in vivo*. После 3 раунда селекции 40 фагов были отобраны, анализ нуклеотидных последовательностей вставок, кодирующих пептид, показал наличие 2-х кластеров: уникальные пептиды [HPSSGSA] и [PVSNKMS] были представлены в 25,9% и 22,2% случаях, соответственно. С помощью иммуноцитохимии и проточной цитометрии оценивали эффективность связывания фагов с опухолевыми клетками глиобластомы *in vitro*. В качестве отрицательного контроля был использован бактериофаг дикого типа. Планируется дальнейшая работа по очистке и характеризации пептидов для последующего коньюгирования с ингибиторами P21 активированной киназы 1 (Pak1).

Данное исследование поддержано проектом РНФ № 19-44-02006 «Таргетная доставка новых ингибиторов P21 активированной киназы 1 (Pak1) в агрессивные клетки глиобластомы путем конъюгации с опухолеспецифическими пептидами, отобранными из фаговой пептидной библиотеки».

Влияние холодной плазменной струи на раковые клетки

Голубицкая Е.А.[1,2], Троицкая О.С.[1], Нуштаева А.А.[1], Закревский Д.Э.[3], Рихтер В.А.[1], Швейгерт И.В.[4], Коваль О.А.[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*
[3] *Институт физики полупроводников СО РАН, Новосибирск, Россия*
[4] *Институт теоретической и прикладной механики СО РАН, Новосибирск, Россия*

Холодная плазма - ионизированный газ, состоящий из заряженных частиц, активных незаряженных частиц, электрического поля и УФ-излучения. Привлекательной особенностью холодной плазменной струи для противоопухолевых исследований является низкая температура в области контакта холодной плазмы с биологическим объектом. На сегодняшний день плазменную струю успешно применяют в экспериментальных моделях in vitro и на животных-опухоленосителях [1]. Целью данной работы является исследование влияния холодной плазменной струи на культуры раковых клеток человека.

В данной работе было проведено сравнение влияния холодной плазменной струи (ХПС) на три культуры раковых клеток: карциномы молочной железы человека BT549, аденокарциномы легкого человека A549, карциномы кожи человека A431. Были оптимизированы условия обработки клеток ХПС при варьировании длительности обработки, величины подаваемого напряжения и способа обработки (прямая обработка клеток или добавление к клеткам среды, обработанной ХПС). Выявлены условия, позволяющие достичь стабильного цитотоксического эффекта.

1. Keidar M. Plasma for cancer treatment // Plasma Sources Sci. Technol. - 2015. - V. 24. - N 3. - P. 1-20.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 19-19-0255.

Физико-химические свойства глицин-морфолиновых аналогов нуклеиновых кислот

Голышев В.М.[1,2], Абрамова Т.В.[2], Пышный Д.В.[2], Ломзов А.А.[1,2]

1 Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины, Новосибирск, Россия
2 Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия

Производные нуклеиновых кислот (НК), в которых рибозофосфатный остов заменен на глицин-морфолиновый (ГМ), являются перспективными соединениями, как для фундаментальных исследований, так и прикладных разработок [1]. Применение данных соединений, у которых отсутствует отрицательных заряд остова, основано на их способности формировать комплексы с комплементарными последовательностями НК. Для оценки перспективности ГМ-аналогов, необходимо изучение свойств, которое в определенной степени затруднено недостаточной отработанностью процедур их химического синтеза, выделения и идентификации. Нами было установлено, что для изучения гибридизационных и структурных свойств новых производных и аналогов НК достаточно пятизвенных олигомеров. Для этого разработана термодинамическая модель, позволяющая достоверно определять термодинамические параметры формирования дуплексных участков и кооперативного контакта в тандемных комплексах НК различной молекулярности [2]. В качестве проверки теоретической модели, была исследована термическая стабильность тандемных комплексов ГМ и дезоксирибонуклеозид пентааденилатов с цепями ДНК и РНК различной длины (10-50 нт и полинуклеотидная цепь). Изучено влияния значений pH (5.5-8) и ионной силы раствора ([Na+]=10-1000 мМ) на их гибридизационные свойства. На основании анализа полученных данных установлено зарядовое состояние ГМ производного при различных значениях pH. Молекулярно-динамическое моделирование позволило установить структурные особенности модифицированных тандемных комплексов и охарактеризовать термодинамические параметры комплексообразования.

Исследование свойств семизвенных ГМ олигомеров гетеронуклеотидного состава при различных концентрациях цепей, буферных условиях и температурах показало формирование антипараллельных комплексов с ДНК и РНК и позволило охарактеризовать гибридизацонные свойства и растворимость таких комплексов.

Совокупность полученных результатов указывает на сложность проведения структурных исследований ГМ-комплексов, при этом демонстрирует ряд преимуществ над уже имеющимися аналогами НК и перспективность применения данных соединений для биомедицинских целей.

1. *Абрамова Т. и др. Синтез и свойства метиленкарбоксамидных миметиков нуклеиновых кислот на основе морфолиновых нуклеозидов //Биоорг. химия. – 2012. – Т. 38. – №. 4. – С. 458-471.*
2. *Golyshev V., Abramova T., Pyshnyi D., Lomzov A. A new approach to precise thermodynamic characterization of hybridization properties of modified oligonucleotides: Comparative studies of deoxyribo-and glycine morpholine pentaadenines //Biophys. Chem. – 2018. – V. 234. – P. 24-33.*

Исследование поддержано проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210021-7.

Рекомбинантные антистазин-подобные белки медицинской пиявки Hirudo medicinalis, полученные в системе экспрессии *Escherichia coli*

Графская Е.Н.[1,2], Бобровский П.А.[1], Волков Д.В.[1,3], Лацис И.А.[1], Бабенко В.В.[1], Манувера В.А.[1,2], Лазарев В.Н.[1,2]

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия*
[2] *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия*
[3] *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Москва, Россия*

Тромбообразование является жизненно необходимым процессом, однако, нарушение тромбообразования является тяжелой патологией. В клинической практике используется ряд модуляторов тромбообразования, обладающих разными свойствами, что обуславливается индивидуальными различиям пациентов и особенностями самого заболевания. Недостаточное или избыточное действие лекарственных средств затрудняет их применение для лечения различных тромбозов. Таким образом, поиск соединений, влияющих на гемостаз, является актуальной социально значимой задачей. Источником искомых соединений может выступать медицинская пиявка, секрет слюнных желез которой содержит сложную смесь биологически активных веществ, обладающих разнообразным спектром действия, в том числе антикоагуляционным [1].

Ранее нами был отсеквенирован геном медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* и проведена его аннотация. По результатам биоинформатического анализа черновой сборки генома медицинской пиявки были отобраны 14 кандидатных генов, кодирующих потенциальные антикоагуляционные агенты. С целью получения выбранных кандидатных белков и дальнейшего исследования их активности, на основе плазмидных векторов были получены конструкции для экпрессии в бактериях *E. coli* генов, кодирующих кандидатные белки. Рекомбинатные белки получали как химерные, в качестве белка носителя выступал шаперон SlyD. После отщепления целевого белка и хроматографической очистки, активность рекомбинантных белков оценивали с использованием тестов АЧТВ и тромбинового времени. Среди протестированных белков один ингибирует свертывание крови и его активность сопоставима с активностью гирудина, известного антикоагулянта пиявки. Получение рекомбинантных высокоактивных антикоагуляционных соединений открывает возможность для разработки новых эффективных фармакологических соединений.

1. *Markwardt F. Hirudin: The Famous Anticoagulant Agent.//Advances in Experimental Medicine and Biology. – 1993. – T. 340. – C. 191-211.*

Исследование было поддержано грантом РНФ № 17-75-20099.

Пептидные конъюгаты направляющих РНКазу Р олиго(2′-О-метилрибонуклеотидов) как основа для создания антибактериальных препаратов

Данилин Н.А.[1], Бардашева А.В.[2], Матвеев А.Л.[2], Тикунова Н.В.[2], Веньяминова А.Г.[2], Новопашина Д.С.[1,2]

[1] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Одной из наиболее актуальных проблем современной химической биологии, биотехнологии и медицины является создание принципиально новых антибактериальных препаратов. Многообещающим подходом к решению данной проблемы является использование EGS-технологии (External guide sequences technology). Эта технология подразумевает создание направляющих олигонуклеотидов (EGS), способных специфично взаимодействовать с определенными бактериальными РНК и вызывать их расщепление бактериальной РНКазой Р. Расщепление происходит благодаря сходству образующегося комплекса РНК с EGS-олигонуклеотидом с природным субстратом РНКазы Р, а именно пре-тРНК.

Целью работы являлось создание новых пептидных конъюгатов олиго(2′-О-метилрибонуклеотидов), способных направлять действие РНКазы Р на мРНК генов ftsZ и gyrA *Acinetobacter baumannii*, и исследование их потенциала в качестве антибактериальных средств. В настоящее время *A. baumannii* относят к высоко инфекционным агентам, обладающим способностью к выживанию в неблагоприятных условиях, способностью формировать биопленки на различных типах поверхностей и проявлять устойчивость к действию широкого ряда антибиотиков. Белковые продукты выбранных генов играют ключевую роль в метаболизме бактериальных клеток, в связи с чем подавление их экспрессии должно приводить к гибели бактерий.

Были получены конъюгаты олиго(2′-О-метилрибонуклеотидов), направляющих РНКазу Р, содержащие взаимодействующий с мембраной пептид на 3′- или 5′-конце. Синтез конъюгатов проводили путем введения малеимидной группировки в аминосодержащие олигонуклеотиды и последующего взаимодействия с пептидом, содержащим на N-конце остаток цистеина. Продемонстрирована способность РНКазы Р расщеплять флуоресцентно меченые РНК-мишени, соответствующие фрагментам мРНК генов ftsZ и gyrA *A. baumannii* в области AUG кодона, в присутствии направляющих модифицированных олигонуклеотидов, и их пептидных конъюгатов. Обнаружено, что наличие пептида на 3′-конце направляющего олигонуклеотида отрицательно сказывается на эффективности расщепления РНК мишеней РНКазой Р, в то время как пептид на 5′-конце практически не уменьшает эффективность расщепления. Показана возможность проникновения пептидных конъюгатов направляющих РНКазу Р олиго(2′-О-метилрибонуклеотидов) в бактерии, а также их способность подавлять рост *A. baumannii* .

Полученные результаты демонстрируют перспективность использования пептидных конъюгатов модифицированных олигонуклеотидов в качестве антибактериальных препаратов, способных проникать в клетки бактерий и направлять действие РНКазы Р.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-04-01892.

Экспресс-диагностика заболеваний человека с помощью современных физико-химических подходов

Дмитриенко Е.В.[1], Ломзов А.А.[1], Наумова О.В.[2], Дульцев Ф.Н.[2], Тронин А.В.[3], Пышный Д.В.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск, Россия*
[3] *ООО «МБС-Технология», Новосибирск,Россия*

Идеальное диагностическое устройство должно обладать следующими характеристиками: маленький объем образца, время получения результата 5-10 минут, простота в использовании, самовалидация и самокалибровка устройства, высокая точность анализа, невысокая себестоимость. Научная проблема разработки такого устройства заключается в необходимости создать универсальную миниатюрную сенсорную систему, которая может быть применима как для выявления взаимодействий различных типов биологических молекул (ДНК-ДНК, белок-белок, белок-лиганд), например, для выявления белковых маркеров методом иммуноанализа (комплексообразования «антиген-антитело»), а также для определения биохимических показателей (измерение активности ферментов или определения их продуктов с помощью электрохимической детекции). В связи с этим успешно развиваются новые высокочувствительные аналитические системы регистрации биомолекулярных маркеров, основанные на сочетании современных молекулярно-биологических и физических методов.

В рамках совместных проектов с ИФП СО РАН и ЗАО «МБС-Технлогия» разработаны и сконструированы современные, высокотехнологичные, высокочувствительные биосенсорные устройства, позволяющие осуществлять безметочное выявление биологических маркеров в режиме реального времени с достижением фемтамольной чувствительности.

Работа выполнена в рамках государственного задания 0309-2016-0004 и при поддержке проекта РНФ 18-14-00357 или № 0309-2018-0017.

Каталитические антитела, гидролизующие нуклеиновые кислоты, как маркер патологии иммунной системы

Ермаков Е.А.[1,2], Кабирова Э.М.[2], Бунева В.Н.[1,2], Невинский Г.А.[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Иммунные процессы играют жизненно важную роль в гомеостазе центральной нервной системы. Аутоиммунные реакции и хроническое воспаление приводят к нарушению функционирования мозга [1]. Одним из признаков нарушений в иммунной системе является образование каталитических антител, или абзимов, способных не только связывать антиген, но и гидролизовать его [2]. Данная работа посвящена исследованию каталитических антител, гидролизующих нуклеиновые кислоты при заболеваниях, связанных с нарушениями нервной системы, в частности, при шизофрении, системной красной волчанке (СКВ) и рассеянном склерозе (РС).

В исследование включены 35 больных шизофренией, 11 больных СКВ, 23 больных РС и 20 здоровых доноров. Из сыворотки крови получали IgG методом аффинной хроматографии на колонке Protein-G-Sepharose. Каталитическую активность IgG оценивали по степени гидролиза плазмиды pBluescript и нейроспецифических микроРНК (miR-137, miR-9-5p, miR-219a-5p и miR-219a-2-3p). Продукты гидролиза анализировали с помощью электрофореза и регистрировали с использованием лазерного сканера Typhoon FLA 9500. Статистический анализ проводили в программе Statistica 10.0.

В работе впервые обнаружены каталитические IgG, способные гидролизовать ДНК и микроРНК при шизофрении, СКВ и РС. IgG здоровых доноров обладали низким уровнем нуклеазной активности. По сравнению со здоровыми донорами, при шизофрении, СКВ и РС нуклеазная активность в реакции гидролиза микроРНК оказалась в 1,2–5 раз выше в зависимости от гидролизуемой микроРНК. Наибольший уровень гидролиза микроРНК (88 %) обнаружен у больных СКВ, кроме того, для них показано наличие большего количества сайтов гидролиза.

Обнаружение каталитической активности антител при шизофрении, наряду с СКВ и РС, является новым доказательством нарушений в иммунной системе этих больных. Разрушение нейроспецифических микроРНК под действием каталитических антител может приводить к нарушению регуляции экспрессии различных генов и способствовать прогрессированию аутоиммунной патологии.

1. *Pape K., Tamouza R., Leboyer M., Zipp F. Immunoneuropsychiatry—novel perspectives on brain disorders // Nature Reviews Neurology. – 2019. – P. 1.*
2. *Ermakov E., Smirnova L., Parkhomenko T., Dmitrenok P., Krotenko N. др. всего 11 человек. DNA-hydrolysing activity of IgG antibodies from the sera of patients with schizophrenia //Open biology. – 2015. – V. 5. – №. 9. – P. 150064.*

Работа частично поддержана базовым проектом ПФНИ ГАН на 2017-2020 гг. (№ VI.62.1.5, 0309-2016-0003) и проектом РНФ № 19-15-00145. Эксперименты, связанные с исследованием антител больных шизофренией, поддержаны стипендией Президента Российской Федерации (СП-2258.2019.4).

Получение триазин амидофосфатных олигонуклеотидных производных – еще одно применение Реакции Штаудингера

Жарков Т.Д.[1,2], Довыденко И.С.[1], Пышный Д.В.[1,2], Купрюшкин М.С.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский Государственный Университет, факультет естественных наук, Новосибирск, Россия*

В настоящее время активно ведется разработка новых лекарств на основе олигонуклеотидов. Более 40 препаратов находятся на различных стадиях клинических испытаний, а уже 6 официально одобрены орагнизацией FDA [1,2]. Все одобренные препараты представляют собой модифицированные олигонуклеотиды, обладающие улучшенными терапевтическими характеристиками по сравнению с их нативными аналогами. На современном этапе развития амидофосфитного метода синтеза олигонуклеотидов введение модификаций возможно проводить в автоматическом режиме.

Одним из перспективных подходов является использование реагента-модификатора на определенном этапе роста олигонуклеотидной цепи. При изменении условий этапа окисления возможно введение модификаций по межнуклеотидной фосфатной группе. Однако, существующие на данный момент реагенты для модификаций по данной группе позволяют создавать лишь ограниченный набор соответствующих олигонуклеотидных производных. Совокупность этих факторов указывает на актуальность разработки новых реагентов для модификации межнуклеотидного фосфата, в том числе позволяющих введение комбинаций функциональных групп. Использование однотипного остова в синтезе таких модификаторов позволило бы сделать этот подход к созданию НК конструкций более гибким.

В рамках данной работы были осуществлены различные подходы к использованию реакции Штаудингера для получения функционализированных триазин-содержащих олигонуклеотидных производных, несущих модельные алкильные заместители. Используя в качестве исходных реагентов различные алифатические амины, азид натрия и цианурхлорид получен широкий набор азид-содержащих соединений-модификаторов, обладающих различной реакционноспособностью при взаимодействии с фосфиттриэфирными производными. Эффективность каждого из полученных реагентов была проверена путем проведения реакции модификации модельных пентатимидилатов с получением триазин-амидофосфатных олигонуклеотидных производных. Полученные реакционные смеси модифицированных олигонуклеотидов были охарактеризованы на предмет протекания реакции методами ОФ ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Произведен анализ преимуществ и ограничений каждого из рассмотренных путей получения реагентов-модификаторов и соответствующих олигонуклеотидных производных.

1. *Rinaldi C., Wood M. J.A. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders // Nature Reviews Neurology. – 2017. – V. 14. – No. 1. – P. 9-21.*
2. *Stein C.A., Castanotto D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017 // Molecular Therapy. – 2017. – V. 25. – No. 5. – P. 1069-1075.*

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 19-14-00204.

Экспрессия аналога кольцевой РНК SIN3A в клетках человека

Журавина М.А.[1,2], Савельева А.В.[1], Нуштаева А.А.[1], Немудрая А.А.[1], Филиппова Ю.А.[1], Степанов Г.А.[1], Семенов Д.В.[1]

1 ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
2 ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Кольцевые РНК (кцРНК) – полирибонуклеотиды, замкнутые в кольцо с образованием 5'-3'-фосфодиэфирной связи между 5'- и 3'-концевыми нуклеотидами транскрипта. КцРНК относят к классу длинных некодирующих РНК и в настоящее время биологические функции кцРНК не установлены. Однако, известно, что индивидуальные кцРНК участвуют в регуляции клеточных процессов за счет конкуренции с мРНК. Стабильность к гидролизу экзорибонуклеазами, секреция во внеклеточное пространство, а также изменение регуляции биосинтеза кцРНК при старении и развитии патологий делает их перспективными объектами для разработки методов диагностики заболеваний человека. Для изучения биологических функций кцРНК нами выбрана кцРНК *SIN3A*, так как известно, что транскрипционный фактор SIN3A является центральным звеном комплекса, регулирующего экспрессию генов. При развитии онкологических заболеваний человека происходит снижение экспрессии гена *SIN3A*, что способствует инвазии опухолевых клеток.

В данной работе для анализа функций кцРНК *SIN3A* был сконструирован и наработан вектор pcDNA-SIN3A, кодирующий 5 и 6 экзоны мРНК *SIN3A*, фланкированные обращенными повторами. Установлено, что трансфекция клеток человека линий A549, MCF-7 и HEK-293 вектором pcDNA-SIN3A приводит к экспрессии аналога кцРНК SIN3A. Показано, что экспрессируемый аналог кцРНК *SIN3A* имеет ковалентно-замкнутую структуру сахаро-фосфатного остова и содержит полноразмерные 5 и 6 экзоны мРНК SIN3A, а также фрагменты транскрипта вектора pcDNA-SIN3A. Установлено, что трансфекция вектором pcDNA-SIN3A приводит к снижению жизнеспособности клеток линий A549, MCF-7 и HEK-293, а также подавляет миграцию клеток линии A549 в культуре.

Проведен анализ изменения уровня серии потенциальных мРНК-мишеней кцРНК *SIN3A*. Установлено, в условиях экспрессии аналога кцРНК *SIN3A* происходит снижение относительного содержания мРНК *MYC*. Транскрипционный фактор MYC участвует в регуляции метаболических и пролиферативных процессов. Это позволяет предложить механизм снижения жизнеспособности клеток линий A549 и HEK-293. Повышение уровня мРНК *STAT3* может быть связано с активацией врожденной иммунной системы в ответ на экспрессию аналога кцРНК *SIN3A* и способствовать снижению жизнеспособности клеток линии HEK-293. В совокупности полученные данные позволяют заключить, что кцРНК *SIN3A* участвует в регуляции таких важных клеточных процессов как пролиферация, миграция и апоптоз.

Работа поддержана проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210024-8.

Доставка олигонуклеотидов в составе нанокомпозитов в организм мышей. Биологическая активность

Зарытова В.Ф.[1], Репкова М.Н.[1], Левина А.С.[1], Шикина Н.В.[2], Мазуркова Н.А.[3], Филиппова Е.И.[3]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт катализа СО РАН, Новосибирск, Россия*
[3] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия*

Решение проблем доставки олигонуклеотидов в клетки и в системы *in vivo* открывает возможность разработки высоко специфических методов воздействия на генетический материал, т. е. на первопричину многих заболеваний. Основой предлагаемой нами системы доставки являются нанокомпозиты TiO_2•PL-ON, состоящие из биосовместимых наночастиц диоксида титана (TiO_2) и нековалентно фиксированных на них полилизин-содержащих олигонуклеотидов (PL-ON).

Ранее было показано, что нанокомпозиты проникают через цитоплазматическую мембрану клеток и обеспечивают транспорт олигонуклеотидов в цитоплазму и ядра клеток. Олигонуклеотид, комплементарный консервативной 3'-некодирующей области вирусной (-)РНК сегмента 5 вируса гриппа А (ВГА) и доставленный в клетки MDCK в составе нанокомпозита, эффективно ингибирует (на 3-4 порядка) репродукцию H5N1, H3N2 и H1N1 субтипов ВГА [1].

В данной работе впервые продемонстрирована возможность использования созданной инновационной системы доставки олигонуклеотидов в организм мышей, инфицированных высокопатогенным субтипом H5N1 ВГА. Оценена токсичность TiO2-наночастиц при разных концентрациях и разных способах их введения. Подобраны условия, при которых отсутствует токсичность нанокомпозитов для нелинейных мышей. Определена эффективность воздействия нанокомпозитов TiO_2•PL-ON при разных (внутрибрюшинном, пероральном, интраназальном и внутривенном) способах их введения в организм лабораторных животных. Выявлено, что оптимальным способом введения нанокомпозита TiO_2•PL-ON в организм мышей является внутрибрюшинная инъекция. В этом случае нанокомпозиты TiO_2•PL-ON в нетоксичных дозах способны эффективно (67% выживших мышей) подавлять репродукцию высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N1, что сравнимо с действием тамифлю (60% выживших мышей). Таким образом, впервые показано, что созданные нанокомпозиты TiO_2•PL-ON являются эффективной системой доставки в организм лабораторных животных фрагментов ДНК, которые способны эффективно взаимодействовать с НК-мишенями.

1. *Levina A., Repkova M., Mazurkova N., Makarevich E., Ismagilov Z., Zarytova V. Knockdown of different influenza A virus subtypes in cell culture by a single antisense oligodeoxyribonucleotide // Int. J. Antimicrob. Agents - 2015. - V. 46(1). - P. 125–128.*

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-15-00133.

CRISPR-системы в микробиомах человека в норме и патологии

Никитин М.С.[1], Захаревич Н.В.[2], Аверина О.В.[2], Ковтун А.С.[1,2], Даниленко В.Н.[1,2], Артамонова И.И.[2,3]

1 Московский физико-технический институт (НИУ), Долгопрудный, Россия
2 Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия
3 Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, Россия

Ведущая роль микробиома кишечника в развитии ожирения несомненна [1]. Специфические изменения в составе кишечного микробиома также характерны для пациентов с расстройствами аутистического спектра (РАС) [2], а непосредственное влияние микробиома на развитие заболевания находит, последнее время, все больше подтверждений [3].

Описание и сравнительная характеристика CRISPR/Cas систем в кишечных пробах (микробиомах) пациентов, страдающих ожирением или РАС, способствует более глубокому пониманию причин и динамики развития этих заболеваний, и потенциально полезны для разработки новых систем их диагностики и даже лечения.

На этапе формирования гипотез о сравнительных отличиях спектра CRISPR/Cas систем в микробиомах людей здоровых и страдающих ожирением или РАС мы выбрали четыре пары микробиомов. Данные в каждой паре близки по размеру, получены в рамках одного и того же проекта, соответствуют пробам от доноров одного пола и примерно одинакового возраста, но отличающихся наличием или отсутствием ожирения, согласно индексу массы тела (для трех пар) или диагнозом РАС (для четвертой пары). Данное сопоставление продемонстрировало: a) более широкое распространение CRISPR/Cas систем; b) большую долю кассет, ассоциированных с *cas*-генами; а также c) более высокое разнообразие типов представленных систем – в микробиомах здоровых доноров по отношению к больным. Исчерпывающая статистическая проверка описанных гипотез, а также выявление систем, встречающихся только в микробиомах больных, будут проведены в рамках этого исследования. Для этого подготовлены микробиомные данные общего доступа, полученные в результате шести различных проектов и охватывающие более тысячи человек из шести стран, для которых доступны индексы массы тела, а также данные, полученные в ходе российского проекта по характеристике микробиомов примерно восьмидесяти детей, страдающих РАС.

1. *Tilg H., Adolph T. Influence of the human intestinal microbiome on obesity and metabolic dysfunction // Curr. Opin. Pediatr. - 2015. - V. 27. - P 496–501.*
2. *Ding H., Taur Y., Walkup J. Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings // J. Autism Dev. Disord. - 2017. - V. 47. - P 480–489.*
3. *Fetissov S., Averina O., Danilenko V. Neuropeptides in the microbiota-brain axis and feeding behavior in autism spectrum disorder // Nutrition. - 2019. - V. 61. - P 43–48.*

Исследование поддержано грантом РФФИ № 18-29-07087.

Фторированные нафтохиноны – ингибиторы CDC 25 фосфатазы – индукторы апоптоза в клетках глиобластомы

Захарова О.Д.[1], Трошкова Н.Д.[2], Живетьева С.И.[2], Эуртивонг Ч.[3], Райниссон Дж.[3], Штейнгарц В.Д.[2], Невинский Г.А.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский институт органической химии СО РАН, Новосибирск, Россия*
[3] *Университет Окленда, Окленд, Новая Зеландия*

Фосфатазы цикла клеточного деления (cell division cycle 25) CDC25A, CDC25B и CDC25C участвуют в регуляции нескольких стадий клеточного цикла [1]. Повышенный уровень экспрессии CDC25 обнаружен во многих типах опухолей. Уровень экспрессии CDC25 в глиобластомах коррелирует со степенью прогрессии опухоли. Глиобластома мультиформная наиболее частая опухоль головного мозга с наиболее агрессивным течением (выживаемость при лечении 15 месяцев, без лечения 3 месяца). Применяемая терапия глиом редко приводит к излечению, вероятно из-за того, что небольшая субпопуляция высокорезистентных клеток опухоли дает начало новой опухоли. Поиск новых внутриклеточных мишеней для лечения глиобластомы – чрезвычайно актуальная задача. Лекарства, ингибирующие ферменты клеточного цикла, могут оказаться перспективными для удаления группы резистентных клеток и предотвратить рецидив глиобластомы

Соединения группы нафтохинонов активно ингибируют CDC25 фосфатазы. Как было показано ранее, 5,6,7,8-тетрафтор-2-(2-гидрокси-этилсульфанил)-[1,4] нафтохинон [2] необратимо ингибирует фосфатазу. В лаборатории В.Д. Штейнгарца синтезировано более 50 полифторированных производных нафтохинона, ряд из них с высокой цитотоксической активностью по отношению к раковым клеткам различных линий. С использованием метода молекулярного докинга осуществлен прогноз биологической активности для производных нафтохинонов. Практически все соединения в модельном эксперименте хорошо встраиваются в активный центр CDC25B фосфатазы, следовательно, могут быть ингибиторами фермента.

В данной работе среди наиболее активных соединений выявлены соединения с цитотоксической активностью в микромолярном диапазоне. Инкубация клеток с этими нафтохинонами вызывала появление 64 % клеток, способных связывать аннексин, благодаря экспозиции фосфатидилсерина на клеточной поверхности из-за нарушения мембран – свидетельство раннего и позднего апоптоза. С помощью красителя JC-1 показана деполяризация мембраны клеток после инкубации с нафтохиноном 1 – что также доказывает апоптотический путь гибели клеток.

1. *Boutros, R.; Dozier, C.; Ducommun, B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. Curr Opin Cell Biol. -2006- 18 - P 185-91.*
2. *Park H., Carr B.I., Li M. and Ham S.W. Fluorinated NSC as a Cdc25 inhibitor. Bioorg Med Chem Lett. -2007- V.17 - P 2351–2354.*

Исследование было поддержано грантом Проект базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210023-1.

Изоформы длинной некодирующей РНК GAS5 в клетках человека

Зинченко Н.Д.[1,2], Савельева А.В.[1], Савиновская Ю.И.[1], Филиппова Ю.А.[1], Нуштаева А.А.[1], Немудрая А.А.[1], Кулигина Е.В.[1], Степанов Г.А[1], Семенов Д.В.[1]

[1] *ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Длинные некодирующие РНК (днРНК) являются востребованными объектами современных молекулярно-биологических и генетических исследований. Ген GAS5 (growth arrest specific 5) человека кодирует 10 коротких мяоРНК и днРНК GAS5. Известно, что уровень днРНК GAS5 снижен в клетках злокачественных опухолей человека. Известно также, что экспрессия днРНК GAS5 в раковых клетках приводит к подавлению пролиферации, снижению жизнеспособности и активации проапоптотических процессов. Поэтому днРНК GAS5 и её изоформы являются перспективными объектами для создания новых подходов к диагностике и терапии онкологических заболеваний человека.

В данной работе проведён биоинформационный анализ данных массового параллельного секвенирования РНК раковых и немалигнизированных клеток человека линий SKOV3, HEK-293, MCF-7, A549, направленный на описание изоформ сплайсинга днРНК GAS5. Установлено, что в клетках человека основной изоформой днРНК GAS5 является транскрипт, состоящий из 12 экзонов. Кроме того, выявлены изоформы сплайсинга пре-днРНК GAS5 с пропуском части экзона 7, с полным пропуском экзона 10, а также с удержанием 3, 7, 8, 9 и 10 интронов. Ранее нами были сконструированы и наработаны плазмидные векторы (pCEP4_7, pCEP4_9, pCEP4_10), экспрессирующие основные изоформы днРНК GAS5 под промотором CMV. Установлено, что трансфекция этими плазмидными векторами сопровождается эктопической экспрессией днРНК GAS5 в клетках человека линий HEK-293 и A549. Трансфекция вектором pCEP4_9, кодирующим изоформу днРНК GAS5 с пропуском части 7 экзона, сопровождается снижением жизнеспособности фибробластов HEK293. Повышение уровня днРНК GAS5 при трансфекции вектором pCEP4_7 приводит к снижению жизнеспособности клеток аденокарциномы лёгких человека A549. Было установлено, что инкубация клеток A549 в среде с циклогексимидом ведёт к снижению уровня эндогенной днРНК GAS5. Трансфекция клеток A549 вектором pCEP4_7, кодирующим полноразмерную изоформу днРНК GAS5, не приводит к изменению мРНК MYC, но приводит к увеличению уровня мРНК транскрипционного фактора BRCA1. Так как BRCA1 является транскрипционным фактором полученные данные позволяют предположить, что экспрессия основной изоформы днРНК GAS5 повышает уровень фактора BRCA1 и модулирует экспрессию BRCA1-зависимых генов.

Работа выполнена при частичной поддержке проекта базового бюджетного финансирования Минобрнауки РФ (0245-2019-0001).

Модификация агарозы для изготовления гидрогелевых ячеек биочипов

Золотов А.М., Чудинов А.В.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

Агароза, линейный гидрофильный полисахарид образующий биосовместимые крупнопористые гели.

Целью работы является разработка иммобилизованных на поверхности полиэтилентерефталатной (ПЭТ) подложке кросс-сшитых трехмерных агарозных гидрогелевых ячеек, с праймерами внутри ячеек, иммобилизованными на термоотщепляемых линкерах. Термостабильность ячеек в условиях ПЦР обеспечивается кросс-сшиванием аморфного агарозного геля в твердую трехмерную сетку, которая ковалентно связана с поверхностью ПЭТ подложки. Термоотщепление праймеров обеспечивается терморасщепляемыми линкерами на основе полигликолевой кислоты. Для кросс-сшивания агарозы выбраны метакрильные группы, которыми модифицирована агароза. Эти же группы используются для ковалентного закрепления агарозных ячеек на подложке.

В данной работе реакцией агарозы с ангидридом метакриловой кислоты синтезированы метакрилатные производные агарозы, с различной степенью замещения гидроксильных групп. Для определения степени замещения использован метод, основанный на реакции аза-Михаэля, в котором флуоресцентный краситель Cy5, содержащий концевую аминогруппу, количественно реагирует с α,β-ненасыщенными связями метакрильных групп. Концентрацию связавшихся молекул красителя оценивали методом флуоресцентной микроскопии по методу [1].

Агарозные ячейки ковалентно связывали с химически активированной поверхностью ПЭТ подложки в ходе кросс-сшивания агарозы. Метод основан на реакции радикального кросс-сшивания модифицированной агарозы с N,N'-метиленбисакриламидом при УФ-облучении с бензофеноном в роли фотоинициатора. Полученные в результате агарозные ячейки не разрушаются и не отщепляются от поверхности ПЭТ подложки при 95oC.

Реакцией агарозы с монохлоруксусной кислотой в условиях градиентного изменения концентрации щелочи получали модифицированую агарозу с карбоксильными группами на полигликолевых линкерах. Карбоксильные группы активировали раствором дисукцинкарбоната в ДМСО, связывали с аминосодержащим производным красителя Cy5. Нагревание при 95oC в ПЦР-буфере приводит к частичному отщепление красителя от агарозы, что свидетельствует о терморасщерлении линкеров. Концентрацию красителя связанного с агарозой до и после термоотщепления оценивали методом флуоресцентной микроскопии по методу [1].

1. *Мифтахов Р.А., Лапа С.А. и др. Получение активных карбоксильных групп на поверхности полиэтилентерефталатной пленки и количественный анализ этих групп с помощью цифровой люминесцентной микроскопии //Биофизика (2018), Т. 63, № 4, С. 661-668.*

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-04-02062а.

Предсказание активности конъюгатов АДФ и морфолиновых нуклеозидов, как нового класса ингибиторов ПАРП-1/ПАРП-2, с использованием методов структурного моделирования

Иванисенко Н.В.[2,3], Шерстюк Ю.В.[1], Захаренко А.Л.[1], Иванисенко В.А.[2], Лаврик О.И.[1], Сильников В.Н.[1], Абрамова Т.В.[1,3]

1 Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
2 Федеральный Исследовательский Центр Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
3 Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия

Семейство белков поли(АДФ-рибозил) полимеразы (ПАРП) играет важную роль в поддержании клеточного гомеостаза, включая репарацию ДНК, поддержание геномной стабильности и регуляцию клеточной гибели. Наиболее изученными представителями данного семейства являются белки ПАРП-1 и ПАРП-2. Белки ПАРП-1/2 катализируют ковалентное связывание поли(АДФ-рибозил)полимеров со своей субъединицей, а также с другими акцепторными белками, используя НАД+ как донора АДФ-рибозы. Ингибиторы поли(АДФ-рибозил)полимераз показали высокую эффективность в улучшении радиотерапии и химиотерапии рака в клинических испытаниях. Разработка новых ингибиторов ПАРП-1 на основе производных природных соединений, таких как НАД+, представляет новую перспективную стратегию. Морфолиновые нуклеозиды широко используются для синтеза миметиков олигонуклеотидов. Однако, активность данного класса соединений против белков семейства ПАРП на сегодняшний день не изучена. В связи с этим в настоящей работе проводился анализ способности конъюгатов АДФ и морфолиновых нуклеозидов связываться с белками ПАРП-1/2 с использованием подходов структурного моделирования, включая методы молекулярного докинга и молекулярной динамики. Полученные результаты показали хорошее согласие с экспериментальными измерениями активности данного класса соединений, полученными ранее. Были предложены механизмы ингибирования ПАРП-1/2 соединениями данного класса. Так, согласно предсказаниям, морфолилурацилсодержащие конъюгаты АДФ способны ингибировать активность ПАРП-1/2 за счёт связывания с никотинамидным карманом каталитического домена. Для морфолиладенинсодержащих конъюгатов АДФ был предсказан новый механизм ингибирования активности ПАРП-1/2, согласно которому, соединения способны связываться с акцепторного сайтом каталитического домена ПАРП-1/2.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 18-04-00352 и бюджетным финансированием ИХБФМ СО РАН по проекту АААА-А17-117020210022-4.

Выявление корреляции генов устойчивости к антибиотикам в кишечном метагеноме с расстройствами аутистического спектра

Ковтун А.С.[1,2], Алексеева М.Г.[1], Аверина О.В.[1], Ребриков Д.В.[3], Даниленко В.Н.[1]

[1] *Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия*
[2] *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия*
[3] *Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

Опубликованные данные по корреляции применения антибиотикотерапии и появления у детей расстройств аутистического спектра (РАС) указывают на возможную тригерную роль антибиотиков в развитии симптоматики аутизма [1]. Применение антибиотиков приводит к изменениям в составе и нарушениям в функционировании микробиоты кишечника (МК), наблюдаемым у детей с РАС, которое рассматривается как расстройство оси микробиота-кишечник-мозг. С другой стороны, показана положительная роль антибиотиков в улучшении симптоматики РАС у детей после антибиотикотерапии. Целью данного исследования является изучение особенностей распространения генов лекарственной устойчивости (ГЛУ) на мобильных генетических элементах у бактерий МК среди больных детей с РАС в мегаполисе г. Москва. В работе исследовались 50 метагеномов МК детей в возрасте от 3 до 5 лет, среди них: 20 образцов – контрольная группа; 30 образцов – дети с РАС. Поиск ортологов генов устойчивости в метагеномах проводился с использованием базы данных ГЛУ ResFinder [2]. Выполнялся поиск ортологов ГЛУ к следующим группам антибиотиков: аминогликозидам, бета-лактамным антибиотикам, гликопептидам, макролидам, тетрациклинам, хинолонам. На основе результатов сравнительного анализа можно утверждать, что МК детей является резервуаром генов устойчивости к аминогликозидам, макролидам, бета-лактамам и антибиотикам тетрациклинового ряда. Селекция по ГЛУ может приводить к отбору видов и штаммов бактерий, обладающих способностью синтезировать продукты, приводящие к РАС. Сигнатурный подход анализа метагенома МК должен быть расширен до 3 компонентов: вид бактерии, сформированная группа функциональных генов и значимая группа ГЛУ. Отобранные ГЛУ могут быть кандидатами в биомаркеры РАС: aac(6')-aph(2"), ant(6)-Ia, erm(B).

1. *Vargason T., McGuinness D.L., Hahn J. Gastrointestinal symptoms and oral antibiotic use in children with autism spectrum disorder: retrospective analysis of a privately insured U.S. population // J. Autism Dev. Disord. – 2018 – V. 49 – № 2 – P. 647-659.*
2. *Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., др. всего 8 человек. Identification of acquired antimicrobial resistance genes // J Antimicrob. Chemother. – 2012 – V. 67 – № 11 – P. 2640-2644.*

Исследование поддержано грантом РНФ № 17-15-01488.

In silico метод для характеризации метагеномной сигнатуры микробиоты кишечника при аутизме

Ковтун А.С.[1,2], Аверина О.В.[1], Полякова С.И.[3], Ребриков Д.В.3, Даниленко В.Н.[1]

[1] *Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия*
[2] *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия*
[3] *Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

Микробиота кишечника (МК) человека может рассматриваться как самостоятельный орган, оказывающий влияние на организм с помощью оси кишечник-мозг благодаря возможности синтезировать различные активные метаболиты. Изменения в бактериальном составе МК коррелируют с различными нейродегенеративными заболеваниями, такими как расстройства аутистического спектра (РАС). МК может быть охарактеризована совокупностью бактериальных родов и ферментов, участвующих в синтезе важных метаболитов – метагеномными сигнатурами (МС). Изменения в таксономическом разнообразии МК, наблюдаемые при нейродегенеративных заболеваниях, будут влиять на МС. Таким образом, изменения в МС могут служить индикатором развивающейся патологии. В данном исследовании, основываясь на разработанном ранее алгоритме [1] выявления сигнатуры нейромодулирующих компонентов когорты здоровых людей, мы выявили изменения в МС, специфичные для пациентов с РАС.

На основании опубликованных данных нами был составлен список из 35 ключевых бактериальных ферментов, участвующих в синтезе метаболитов, коррелирующих с развитием аутизма. Также нами был создан каталог ортологов данных ферментов, состоящий из 437 аминокислотных последовательностей. Далее мы разработали биоинформатический метод для определения МС, характеризующихся данными ферментами и их ортологами. Данный подход был использован для анализа метагенома МК 30 детей с РАС и 20 детей из контрольной группы.

По результатам сравнительного анализа МС были выявлены различия в коровых сигнатурах для ферментов, участвующих в формировании короткоцепочечных жирных кислот, синтезе спермидина, мелатонина ГАМК, триптофана, глутатиона у таких ключевых родов бактерий, как *Clostridium, Megasphaera* и *Prevotella*.

1. *Kovtun A.S., Averina O.V., Zakharevich N.V., Kasianov A.S., Danilenko V.N. In silico Identification of Metagenomic Signature Describing Neurometabolic Potential of Normal Human Gut Microbiota // Russian Journal of Genetics. – 2018 – V.54 -№ 9 – P. 1101-1110*

Исследование поддержано грантом РНФ № 17-15-01488.

Роль микрофлоры и метаболизма в регуляции поведения на модели животных с предрасположенностью к воспалению кишки

Кожевникова Е.Н.[1,2,3], Борисова М.А.[4], Снытникова О.А.[5,6], Васильева Н.Р[5,6], Литвинова Е.А.[1,4], Ачасова К.М.[2,4], Дубовский И.М.[2,7]

[1] *Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН; Новосибирск, Россия*
[3] *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН; Новосибирск, Россия*
[4] *Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*
[5] *Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск, Россия*
[6] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*
[7] *Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия*

Нарушения состава микрофлоры сопутствуют таким заболеваниям, как болезнь Крона и неспецифический язвенный колит. Зачастую такие заболевания также осложнены симптомами со стороны центральной нервной системы, такими как тревожность, депрессия и другие. В данном исследовании были использованы самцы мышей с нокаутом гена *Muc2 (Muc2*$^{-/-}$), которые предрасположены к развитию колита и рака кишки. В «тесте с двумя интрудерами» самцы *Muc2*$^{-/-}$ атаковали и демонстрировали половое поведение как на самцов, так и на самок (p (атаки на самок)<0.01*vs* C57Bl; p (садки)<0.05*vs* C57BL/6, критерий $\chi 2$). Самцы *Muc*$^{+/+}$, полученные в ходе скрещивания гетерозиготных родителей, также показывали подобный тип поведения. Метагеномный анализ и метаболомное исследование сыворотки крови показали существенные изменения микрофлоры кишки и метаболизма у самцов групп *Muc2*$^{-/-}$ и *Muc*$^{+/+}$ в сравнении с контрольными животными C57BL/6. В частности, наблюдалось снижение видов бактерий *Escherichia coli* и *Blautia coccoides*, а также происходило снижение незаменимых аминокислот и производных масляной кислоты. Эти данные говорят в пользу того, что нарушение метаболизма и социального поведения в этой модели, скорее, связано с измененным составом микрофлоры кишки, нежели с наличием самой мутации в гене *Muc2*.

Исследование было поддержано грантами РФФИ № 19-015-00169 (в части метаболомного анализа) и № 18-315-00269 (в части исследования поведения животных), и РНФ № 18-74-00057 (в части метагеномного анализа). Лабораторные животные были приобретены при поддержке бюджетного проекта # 0324-2019-0041.

Анализ вклада нарушений аутофагии в развитие возрастной макулярной дегенерации

Кожевникова О.С., Телегина Д.В., Колосова Н.Г.

ФИЦ Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) становится основной причиной потери зрения пожилыми людьми. Нарушение с возрастом аутофагии – процесса доставки компонентов цитоплазмы для деградации в лизосомы, рассматривается как один из факторов, способствующих развитию ВМД. Механизмы нарушения аутофагии с возрастом и их вклад в ВМД остаются слабо изученными. Оценку вклада изменений аутофагии в развитие ВМД исследовали на крысах OXYS, у которых развивается ретинопатия, по клиническим признакам аналогичная ВМД. Проведен анализ транскриптома сетчатки крыс OXYS для определения дифференциально экспрессирующихся генов, участвующих в реализации механизма аутофагии на разных этапах развития ретинопатии. Изменения экспрессии генов, ассоциированных с аутофагией, выявлены в сетчатке крыс OXYS уже на «доклинической» стадии. Так, в 20 дней и в период манифестации признаков ВМД изменения экспрессии ассоциированы с киназной активностью, иммунными процессами и сигнальными путями FoxO, mTOR, PI3K-Akt, MAPK, AMPK и нейротрофинов. В период прогрессии признаков ВМД изменения экспрессии генов связаны с транспортом везикул и процессами в лизосомах, свидетельствующие о нарушении аутофагического потока.

Проведено сравнение изменений с возрастом состояния и реактивности процессов аутофагии в сетчатке крыс OXYS и Вистар. Для этого активировали процесс аутофагии голоданием или подавляли его введением ингибитора аутофагии хлорохина (CQ). Установлено, что ответ на модуляцию аутофагии на транскрипционном уровне у OXYS выражен слабее, чем у крыс Вистар. Наиболее существенные межлинейные различия в изменении уровня мРНК генов Atg5, Atg7, Becn1, Nbr1, p62 и Gabarapl1 в ответ на голодание выявлены в сетчатке 16-месячных животных. Также различались у крыс OXYS и Вистар изменения уровней мРНК Atg5, Atg7, Becn1, Gabarapl1, Lc3b и Nbr1 в ответ на CQ, который нивелировал эффекты голода. Нарушения реактивности системы аутофагии в сетчатке крыс OXYS подтверждает пониженное количество аутофагосом в сетчатке в условиях блокирования аутофагосомно-лизосомального слияния, свидетельствующее о сниженной скорости формирования новых аутофагосом. Более того, у крыс OXYS соотношение количества LC3+ везикул у получавших CQ и контрольных крыс было меньше, чем у Вистар во всех слоях сетчатки, что указывает на замедление процесса их удаления.

Таким образом, манифестация и прогрессия признаков ВМД в сетчатке крыс OXYS происходят на фоне изменения экспрессии генов, ассоциированных с процессом аутофагии, и снижения реактивности - способности к усилению аутофагического потока в ответ стресс. В целом результаты свидетельствуют в пользу того, что изменения состояния и реактивности процесса аутофагии могут вносить вклад в патогенез ВМД на всех этапах развития патологического процесса.

Поддержано РНФ № 18-75-00031.

Бактериофаг SA20, способный разрушать биопленки, сформированные различными видами стафилококков

Козлова Ю.Н., Бардашева А.В., Тикунова Н.В.

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

В последние годы участились случаи гнойно-септических поражений у людей, вызванных не только бактериями *Staphylococcus aureus*, но и другими видами стафилококков – *Staphylococcus capitis, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus pseudintermedius* и др. Фактором, осложняющим лечение инфекций, вызванных стафилококками, является способность этих бактерий образовывать биоплёнку на поверхности пораженных участков тканей. Формирование биопленок ухудшает возможность доставки антибактериальных средств в очаг воспаления, следствием чего является наличие у бактерий повышенной устойчивости к воздействию антибактериальных препаратов. Для дестабилизации и разрушения биопленок могут быть использованы бактериофаги, содержащие в составе своих капсидов белки с различной деполимеризующей активностью в отношении структур биопленок.

Стафилококковый бактериофаг SA20, обладающий литической активностью в отношении широкого спектра бактерий рода *Staphylococcus*, был тестирован на способность к разрушению биопленок, сформированных in vitro клиническими штаммами *S. aureus, S. capitis, S. epidermidis* и *S. haemolyticus*. Формирование биопленок проводили на покровных стеклах в жидкой питательной среде Luria-Bertani (LB) при инкубировании в течение трех суток при температуре 370С. Сформированную пленку выявляли окрашиванием генцианфиолетовым. К сформированным биопленкам добавляли бактериофаг SA20 в титре $5x10^7$ БОЕ/мл и инкубировали фаговую суспензию с биопленками в течение суток при температуре 370С. Методом световой микроскопии оценивали влияние бактериофага на структуру биопленки нативных и окрашенных генцианфиолетовым образцов. В результате было выявлено, что инкубация с бактериофагом SA20 приводит к исчезновению экзополисахаридного матрикса, разрушению биопленки и уничтожению бактерий, находящихся в планктонной форме и в экзополисахаридном слое. Таким образом, бактериофаг SA20 обладает деградирующей активностью в отношении биопленок, сформированных различными видами стафилококков и может быть использован для их разрушения.

Работа выполнена в рамках проекта ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210027-9.

Изучение разнообразие фаговых пептидных библиотек при помощи массового параллельного секвенирования

Колосова Е.А.[1,2], Морозов И.В.[3], Бондарь А.А.[3], Шаповал А.И.[2], Гершони Дж.М.[4], Щербаков Д.Н.[1,2]

[1] *ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия*
[2] *ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул, Россия*
[3] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[4] *Тель-Авивский Университет, Тель-Авив, Израиль*

Возникновение онкологических или аутоиммунных заболеваний сопровождается изменением иммунных реакций организма. Иммунная регуляция с использованием антител, блокирующих определенные стадии иммунного ответа является важным инструментом для онкологических заболеваний. Однако терапевтические антитела имеют недостатки: высокую иммуногенность, неспецифические иммунологические реакции, плохое проникновение в ткани и т.п. Пептиды, способные взаимодействовать и блокировать ко-регуляторные молекулы, могут обеспечить альтернативный подход к управлению иммунным ответом при различных заболеваниях.

В последние годы в связи с развитием методов высокопроизводительного параллельного секвенирования и высокоточной печати пептидных микрочипов [1] появилась возможность масштабного анализа разнообразия активных центров ко-регуляторных молекул. Эти методы позволяют поднять на более высокий уровень знания о работе иммунной системы. Таким образом, разработка методов отбора пептидов и оценки их взаимодействия с ко-регуляторными молекулами является актуальной задачей.

Первым этапом поиска с использованием фаговых пептидных библиотек пептидов, специфически связывающихся с ко-регуляторными молекулами, является оценка разнообразия библиотек. В работе использовали фаговую пептидную библиотеку GerLab, а также коммерческую библиотеку Ph.D. 12 NEB. Подготовка фаговых библиотек к высокопроизводительному массовому секвенированию была осуществлена посредством полимеразной цепной реакции в ранее оптимизированных условиях. Анализ полученных последовательностей, кодирующих синтетические пептиды на поверхности бактериофагов, показал отсутствие перепредставленных последовательностей в библиотеках NEB (наиболее часто встречающаяся последовательность составляла 0,15%). Для библиотеки GerLab наиболее представленная последовательность, гомологичная последовательности генома исходного фага, составляла 12,5%. Для удаления перепредставленных последовательностей из библиотеки фагов мы разработали оригинальный алгоритм предварительной фильтрации исходных данных, полученных с помощью платформы IonProton.

1. *Podlesnykh S.V. et al. Development of Search Strategy for Peptide Inhibitors of Immune Checkpoints //Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2018. – Т. 44. – №. 2. – С. 150-157.*

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-44-220008\19 и государственного задания Минобрнауки России №6.3892.2017/4.6.

Оптимизация подготовки фрагментных библиотек для транскриптомного анализа *Mycobacterium tuberculosis*

Кострюкова Е.С., Климина К.М., Беспятых Ю.А., Шитиков Е.А.

ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия

Транскриптомный анализ посредством высокопроизводительного параллельного секвенирования (RNA-seq) в настоящий момент является наиболее информативным подходом для изучения экспрессии генов любых живых организмов, как прокариотических, так и эукариотических. При этом одной из проблем, возникающих перед исследователями, является необходимость удаления из анализируемого образца молекул рибосомальных РНК (рРНК) с максимально возможной сохранностью представленности остальных типов транскриптов, присутствующих в малых по сравнению с рРНК количествах.

Очень часто для решения этой задачи применительно к образцам эукариотической ДНК используют подход получения полиА-фракции, таким образом эффективно избавляясь от рРНК, но теряя некодирующие транскрипты, которые в настоящий момент наравне с кодирующими привлекают самое пристальное внимание исследователей. В случае прокариотических организмов такой возможности нет, и удаление рРНК производят либо путем нормировки готовых библиотек, либо с использованием систем RiboMinus.

В данной работе осуществлена адаптация протокола ScriptSeq Complete Gold Kit (Epidemiology) depletes rRNA from human/mouse/rat and bacteria (Illumina) для подготовки транскриптомных библиотек РНК Mycobacterium tuberculosis для последующего высокопроизводительного секвенирования с использованием секвенаторв линейки Illumina (США). Оптимизация этапов выделения РНК, обработки ДНКазой и элюции на этапах очистки позволила получить библиотеки, обеспечивающие последующее репрезентативное секвенирование не только образцов РНК, полученных собственно из бактериальной культуры, но и обнаружить транскрипты бактериальной природы в образцах тканей легкого мышей, зараженных данным возбудителем.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 17-15-01412.

In vivo регистрация динамики изменения pH в тканях головного мозга крыс при ишемическом инсульте

Кельмансон И.В.[1,2], Почечуев М.С.[3], Котова Д.А.[1], Костюк А.И.[1,2], Панова А.С.[1,2], Бородинова А.А.[4], Федотов И. В.[3], Ланин А.А.[3], Мартынов Г.Н.[3], Балабан П.М.[4], Федотов А.Б.[3], Желтиков А.М.[3], Белоусов В.В.[1,2], Билан Д. С.[1,2].

[1] *Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*
[2] *Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия*
[3] *Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия*
[4] *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

Ишемический инсульт головного мозга имеет сложную патофизиологию, затрагивающую различные системы организма, поэтому крайне важны исследования на моделях *in vivo*. Генетически кодируемые флуоресцентные индикаторы являются современным и востребованным подходом для решения многих задач в области биологии и медицины.

С помощью биосенсора SypHer3s [1] мы регистрировали в режиме реального времени динамику величины pH в клетках головного мозга крыс при ишемическом инсульте с первых секунд развития патологии. Предварительно с помощью стереотаксического манипулятора крысам линии Wistar Kyoto в кору головного мозга обоих полушарий были инъецированы частицы аденоассоциированного вируса, несущего ген биосенсора SypHer3s. Сразу после инъекции в эти же координаты мозга животным были вживлены короткие отрезки оптического волокна. Через 3 недели к вживленным в мозг оптическим волокнам подключалась высокочувствительная установка для возбуждения и регистрации флуоресцентного сигнала биосенсора SypHer3s в тканях мозга крысы. В режиме непрерывной регистрации сигнала животным проводилась хирургическая манипуляция по моделированию левостороннего ишемического инсульта посредством временной окклюзии средней мозговой артерии с помощью специального филамента.

С помощью данного подхода мы зафиксировали понижение pH в тканях больного полушария с первых минут после окклюзии сосуда. Еще более выраженное изменение pH мы зарегистрировали при восстановлении кровотока. Примечательно, что резкое изменение pH регистрируется также в здоровом полушарии. Таким образом, по полученным данным ацидоз в тканях мозга начинается с первых секунд развития патологии и затрагивает оба полушария, что свидетельствует о глобальном экстраклеточном изменении pH при ишемии-реперфузии. Данное наблюдение может оказаться крайне важным для изучения патогенеза инсульта и подбора терапии лечения в будущем.

1. *Ermakova Y.G., Pak V.V., Bogdanova Y.A., Kotlobay A.A., Yampolsky I.V., Shokhina A.G., Panova A.S., Marygin R.A., Staroverov D.B., Bilan D.S., Sies H., Belousov V.V. SypHer3s: a genetically encoded fluorescent ratiometric probe with enhanced brightness and an improved dynamic range. // Chem. Commun. (Camb.). – 2018. – V. 54. – P 2898-2901.*

Исследование поддержано грантом РНФ № 17-15-01175.

Целентеразин-зависимые люциферазы как аналитический инструмент для фундаментальных и прикладных исследований

Красицкая В.В., Башмакова Е.Е., Кудрявцев А.Н., Франк Л.А.

Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия

Люциферазы многих морских светящихся организмов, сильно различающиеся по структуре и механизму реакций, катализируют окисление одного и того же субстрата – целентеразина либо его аналогов. Люциферазами особого типа являются Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины, представляющие стабильный нековалентный комплекс полипептид-кислород-целентеразин, биолюминесценция которого возникает в виде однократной яркой вспышки при присоединении ионов Ca^{2+}. Доступность и простое строение целентеразин-зависимых люцифераз, стабильность при хранении и химических и генно-инженерных модификациях, высокий квантовый выход биолюминесцентной реакции определяют перспективность их применения как репортерных молекул в различных аналитических системах.

Биолюминесценция обелина – фотопротеина гидроидного полипа *Obelia longissima*, при насыщающих концентрациях Ca^{2+} характеризуется практически неограниченным линейным диапазоном зависимости величины светового потока от содержания белка. Направленным мутагенезом получены варианты обелина с измененными спектрами излучения, кинетикой реакции, а также в виде гибридов с биоспецифическими молекулами. Химические коньюгаты обелина с антителами и олигонуклеотидами использовали для высокочувствительного выявления ряда диагностически значимых мишеней, в том числе и в клинических образцах в иммуно- и гибридизационном анализе, а также при выявлении однонуклеотидных полиморфизмов. Генетический гибрид стрептавидин-обелин является меткой при выявлении любых молекул, имеющих биотиновый фрагмент, а гибрид белок А-обелин был успешно использован для выявления иммуноглобулинов и изучения их аффинности. На основе биолюминесцентного сигнала обелиновых репортеров разработан способ быстрого мониторинга селекса и оценки аффинности ДНК аптамеров.

Разработанный твердофазный биолюминесцентный способ на основе РНК или ДНК аптамерной сенсорики использовали при выявлении патогенных анти-ОБМ аутоантител в крови пациентов страдающих рассеянным склерозом, а также при определении мишеней, циркулирующих в крови пациентов при раке легкого.

Гибридные белки, включающие люциферазу мягкого коралла *Renilla muelleri* и антитела к различным мишеням, обладают высокой чувствительностью при выявлении соответствующих антигенов. На основе гибрида с вариабельными доменами антитела к вирусу клещевого энцефалита разработан и успешно использован биолюминесцентный способ обнаружения этого вируса в образцах клещей. Испытания этого способа при анализе около тысячи клещевых экстрактов показали его надежность (с чувствительностью 89,5% и специфичностью 98,9%).

Возможность проведения анализа в высокопроизводительном микропланшетном варианте, доступность и высокая чувствительность люциферазных меток делают их удобным инструментом для фундаментальных и прикладных исследований.

Анализ молекулярных механизмов необычной устойчивости к бактериофагам уропатогенного штамма *E. coli* UP11

Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Летаров А.В.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Уропатогенный штамм кишечной палочки UP11 был выделен нами в 2014 г. от пациента с инфекцией мочевыводящих путей. Он обратил на себя наше внимание крайне низкой встречаемостью бактериофагов, способных его инфицировать. Мы провели первичную работу по поиску молекулярных механизмов, обеспечивающих эту устойчивость, методами биоинформатического анализа генома этого штамма, и пришли к выводу, что классические системы клеточной защиты (рестрикция-модификация, CRISPR/Cas) не могут объяснить необычную устойчивость данного штамма к фагам, и его устойчивость, скорее всего, определяется прежде всего свойствами его О-полисахарида (ОПС), определяемого ЯМР-анализом как тип О5. ОПС этого штамма, вероятно, обладает способностью эффективно блокировать фаговую инфекцию.

Для дополнительной проверки этого вывода мы изучили характер устойчивости мутантов штамма UP11, отобранных на резистентность к фагам St11Ph5 (G7C-подобный вирус) и St11Ph6 (Vi1–подобный вирус). Изучение кривых адсорбции показало, что с клетками дикого типа оба фага связываются почти полностью за 7-10 мин. При этом мутантные клетки производных UP11 сохраняют способность связывать фаг, однако в условиях эксперимента 40-50% вируса остается не адсорбированным даже через 30 мин после начала опыта. Обработка адсорбционной смеси вирицидным раствором, инактивирующим свободные фаговые частицы, приводит к полной инактивации фага в смеси с устойчивыми клетками, в то время как в смеси с диким типом образуются инфицированные клетки, внутри которых фаг защищен от воздействия раствора. Таким образом, адсорбция фагов на устойчивые клетки является обратимой или неспецифической. Соответственно, устойчивость полученных изолятов носит адсорбционный характер.

Один из немногих обнаруженных нами вирусов, способных к инфекции штамма up11, фаг St11Ph5, является близкородственным N4-подобному фагу G7C, процесс адсорбции которого ранее была нами исследован весьма детально. Несмотря на очевидное сходство, стратегии инфекции этих вирусов существенно различаются. Если распознавание О-антигена является необходимой стадией при инфекции G7C, то в случае фага St11Ph5 это не так. В отличие от близкородственного фага G7C, фаг St11Ph5 не вызывает отбора лишённых ОПС rough-мутантов, не изменяет ни структуры ОПС, ни представленности основных мажорных белков внешней мембраны.

Идентификация конечного рецептора этого фага и вирусного белка, связывающегося с ним, могли бы дать ценную информацию о механизмах возникновения необычной устойчивости к фагам. Секвенирование мутантов, устойчивых к этому вирусу, к сожалению, не позволило нам однозначно идентифицировать рецептор. Мы рассчитываем, однако, решить эту задачу с помощью транспозонного мутагенеза и/или новых технологий секвенирования.

Работа поддержана грантом РНФ №15-15-00134.

Системная биология медицинской пиявки. От «омиксных» технологий до создания лекарств

Лазарев В.Н.

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

На протяжении нескольких тысяч лет человечество использует кровососущих пиявок для лечения различных заболеваний. Компоненты слюны пиявки уменьшают воспаление, обладают тромболитическим, обезболивающим и антикоагуляционным действием, имеют антимикробную активность. Несомненно, медицинскую пиявку можно назвать природной фармакопеей, написанной в ходе эволюции.

Несмотря на огромный интерес к исследованию компонентного состава слюны медицинской пиявки, данные по геномике, транскриптомике слюнных желез, протеомике слюны и метагеномике медицинской пиявки в настоящее время малочисленны и фрагментарны. Мы определили полную нуклеотидную последовательность генома *Hirudo medicinalis*, провели полное транскриптомное профилирование слюнных желез, глубокий протеомный и пептидомный анализ слюны трех видов медицинских пиявок (*H. medicinalis, H. verbana, H. orientalis*). Нами был разработан протокол сбора секрета клеток слюнных желез медицинских пиявок, а также протокол лазерной микродиссекции клеток слюнных желез пиявки.

Мы идентифицировали секрет-специфичные белки и пептиды медицинской пиявки, а также обнаружили ранее не описанные белки и пептиды, потенциально обладающие антимикробным, тромболитическим, антикоагуляционным, обезболивающим действиями. Некоторые пептиды были химически синтезированы, белки были получены при гетерологичной экспрессии в *E.coli* и клетках человека. Кроме того, мы провели метагеномный анализ микробиоты разных отделов пищеварительного тракта медицинских пиявок трех видов с целью определения его метаболического потенциала.

Наши данные не только уточняют механизмы взаимодействия белков и пептидов секрета медицинской пиявки с некоторыми звеньями гомеостаза человека, но являются основой для создания новых лекарственных препаратов: антимикробных соединений, тромболитиков и антикоагулянтов нового поколения.

1. *Babenko V. et. al., Far beyond common leeching: insights into an ancient medical device through integrated omics data // 2018, bioRxiv, doi: https://doi.org/10.1101/357681.*

Исследование было поддержано грантами РНФ № 14-14-00696, № 17-75-20099.

Изучение одновременного ферментативного встраивания разноименных Cy5-модифицированных дезосксипиримидинов в ДНК для гибридизационного анализа на биочипах

Лапа С.А., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Чудинов А.В.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Введение флуоресцентных меток в ДНК широко применяется в молекулярно-биологических исследованиях и клинической диагностике. Широко распространены цианиновые красители ряда Cy5, стабильные в условиях ПЦР. При ферментативном введении Cy5-модифицированных нуклеотидов в ДНК важным параметром является способность соответствующих трифосфатов (Cy5-dNTP) восприниматься ДНК-полимеразами в качестве субстратов. Показано, что наиболее эффективной для введения Cy5-dUTP является концентрация 8 μM, или отношение модифицированый/природный трифосфат, равное 4% [1]. Разработка методов одновременного введения различных флуоресцентно-меченных нуклеотидов (например, dU и dC) в одну растущую цепь ДНК позволит увеличить удельную плотность введения меток и повысит чувствительность анализа.

Нами исследовано одновременное ферментативное встраивание дезоксиуридина (Cy5-dU) и дезоксицитидина Cy5-dC, модифицированных одним и тем же флуорофором (электронейтральное сульфопроизводное Cy5-ряда), связанным с 5-положением азотистого гетероцикла идентичными линкерами (лабораторное обозначение соединений dU2 и dC128). В качестве полимераз выбраны Taq и Vent (exo-) с отсутствующей 3'-5' экзонуклеазной активностью, что не позволяет этим ферментам выщеплять «ошибочно» встроенные неприродные Cy5-dN. Для оценки эффективности встраивания Cy5-dN измеряли флуоресцентный сигнал меченой ДНК, гибридизованной с зондами биологического микрочипа «ТБ-Биочип».

При индивидуальном независимом использовании Cy5-dUTP и Cy5-dCTP интенсивности сигналов сравнимы для обоих модифицированных dNTP при оптимуме 8 μM. Одновременное использование Cy5-dUTP и Cy5-dCTP в концентрации каждого 4 μM (суммарно 8 μM) приводит к интенсивности сигнала, как при независимом использовании в концентрации 8 μM. Увеличение концентрации при индивидуальном использовании до 16 μM приводит к снижению сигнала, вызванному ингибированием как для Cy5-dUTP, так и для Cy5-dCTP. Одновременное использование в концентрации каждого по 8 μM (суммарно 16 μM) не приводит к уменьшению сигнала, а напротив, к его увеличению в 1,5 раза по сравнению с независимым использованием в концентрации 8 μM.

Таким образом, показана возможность встраивания разноименных модифицированных dN в одну цепь ДНК. Одновременное использование трифосфатов обоих типов (Cy5-dUTP и Cy5-dCTP) приводит к заметному увеличению чувствительности гибридизационного анализа.

1. *Shershov V.E., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., др. всего 9 человек. Comparative Study of Novel Fluorescent Cyanine Nucleotides: Hybridization Analysis of Labeled PCR Products Using a Biochip. // J. Fluoresc. – 2017. – V. 27. - P 2001 – 2016.*

Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-04-01217.

N-концевое ацетилирование рекомбинантных белков эукариот в *E.coli*

Лаптева Ю.С., Соколов А.С., Вологжанникова А.А., Казаков А.С., Пермяков С.Е.

ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пущино, Россия

Большинство белков эукариот подвергается N-концевому ацетилированию, что может существенным образом изменять их структурные и функциональные свойства [1]. Рекомбинантные белки эукариот, нарабатываемые в бактериях, часто не содержат данную модификацию. В этой связи актуальна разработка метода N^{α}-ацетилирования (N^{α}-АЦ) рекомбинантных белков, получаемых в бактериальных системах экспрессии. N^{α}-АЦ катализируют специфичные ферменты - N-концевые ацетилтрансферазы (АТ), различающиеся по субстратной специфичности, которая зависит от N-концевой аминокислотной последовательности ацетилируемого белка. АТ эукариот являются, как правило, мультисубъединичными ферментами, в то время как их бактериальные аналоги содержат по одной субъединице [2]. В связи с этим актуально использование АТ *E. coli* для N^{α}-АЦ рекомбинантных белков эукариот при их наработке в *E. coli*.

Ранее нами было установлено влияние N-концевой ацетильной группы на структурные и функциональные свойства некоторых парвальбуминов (ПА) [3, 4]. Парвальбумины - это небольшие кальцийсвязывающие белки позвоночных, выполняющие в организме роль буфера катионов кальция/магния. Нами изучена активность АТ *E. coli* в отношении рекомбинантного α-ПА щуки в условиях *in vivo* и *in vitro*. Нами клонированы гены АТ RimI, RimJ и RimL и получены очищенные препараты ферментов для проведения реакции N^{α}-АЦ в условиях *in vitro*. Для N^{α}-АЦ в условиях in vivo нами получены плазмидные вектора, предназначенные для ко-экспрессии АТ и α-ПА щуки в клетках *E. coli*. Содержание N^{α}-АЦ формы ПА оценивали методом масс-спектрометрии.

Нами впервые показано, что ни одна из АТ *E.coli* не проявляет активность в отношении α-ПА щуки в условиях *in vitro*. В условиях *in vivo* специфическую ферментативную активность проявляет АТ RimI. При этом уровень N^{α}-АЦ формы ПА зависит от условий роста *E.coli* при ко-экспрессии и может достигать 30%. Наши результаты согласуются с имеющимися в мировой литературе данными о том, что для ацетилирования важное значение имеет как аминокислотная последовательность N-конца белка, так и его третичная структура.

1. *Drazic, A., et al. The world of protein acetylation // Biochim. Biophys. Acta. - 2016. – V. 1864: P 1372-1401.*
2. *Favrot, L., J.S. Blanchard, and O. Vergnolle, Bacterial GCN5-Related N-Acetyltransferases: From Resistance to Regulation // Biochem. - 2016. – V. 23. -P 989–1002.*
3. *Vologzhannikova, A.A., et al. In search for globally disordered apo-parvalbumins: Case of parvalbumin β-1 from coho salmon // Cell Calcium. - 2017. – V. 67. - P 53-64.*
4. *Permyakov, S.E., et al. The impact of alpha-N-acetylation on structural and functional status of parvalbumin // Cell Calcium. - 2012. – V. 52 (5). – P 366-76.*

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-00701.

Миобласты от доноров с ЛЛПМД стимулируют пролиферацию МСК и продукцию коллагена в очаге воспаления

Латыева О.О.[1,2], Киселева Е.В.[1,2], Васецкий Е.С.[2,3]

[1] *РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*
[2] *ИБР им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия*
[3] *Институт онкологии Густава-Русси, Париж, Франция*

Лице-лопаточно-плечевая мышечная дистрофия (ЛЛПМД) – аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся прогрессирующим ослаблением большинства скелетных мышц [1]. В процессе заболевания происходит дегенерация и замена мышечной ткани жировой и соединительной (фиброз). Основная форма ЛЛПМД связана с аберрантной экспрессией гена DUX4, закодированного в массиве повторов D4Z4 на хромосоме 4q35 [2]. Ранее нами было показано, что гиперэкспрессия DUX4 в миобластах может стимулировать миграцию мультипотентных стромальных клеток (МСК) за счет увеличения продукции цитокина CXCL12 [3]. Мигрирующие в пораженную мышечную ткань МСК могут влиять на миогенную дифференцировку и провоцировать фиброз.

Цель работы – исследовать взаимное влияние МСК и миобластов в модельной системе ЛЛПМД *in vitro*.

В работе использовали культуры первичных (ПМ) и иммортализованных (ИМ) миобластов от здоровых и больных ЛЛПМД доноров, а так же миобласты, трансфицированные DUX4 (Институт миологии, Париж).

Мы показали, что ЛЛПМД ИМ увеличивают пролиферацию МСК в 1,5 раза сильнее по сравнению с нормальными миобластами. Мы не обнаружили различий в адипогенной дифференцировке МСК в ко-культуре с ИМ. МСК могут влиять на синтез и секрецию VEGF миобластами в очаге воспаления. Иммуноферментным методом показано, что базальный уровень синтеза и секреции VEGF в ЛЛПМД ИМ выше, чем в здоровых ИМ в 4 и 27 раз соответственно. Секретируемые МСК факторы увеличивают уровень синтеза и секреции VEGF в ИМ от здоровых доноров (в 5 и 14 раз соответственно) и не влияют на эти показатели в ИМ от больных доноров. В свою очередь, ИМ от пациентов с ЛЛПМД увеличивают уровень синтеза и секреции коллагена МСК в условиях воспаления.

Таким образом, в очаге поражения миобласты могут стимулировать пролиферацию мигрировавших МСК и продукцию ими коллагена, а МСК влиять на экспрессию факторов, связанных с ангиогенезом. Такое взаимное влияние, вероятно, может быть одной из причин фиброза мышц при ЛЛПМД.

1. *Hamel J., Tawil R. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: Update on pathogenesis and future treatments //Neurotherapeutics. – 2018. – Т. 15. – №. 4. – С. 863-871.*
2. *Lemmers R. J. L. F. et al. A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy //Science. – 2010. – Т. 329. – №. 5999. – С. 1650-1653.*
3. *Dmitriev P. et al. Dux4 controls migration of mesenchymal stem cells through the Cxcr4-Sdf1 axis //Oncotarget. – 2016. – Т. 7. – №. 40. – С. 65090.*

Работа проводится в рамках темы Государственного задания ИБР РАН и Программы президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий».

Олигонуклеотид-содержащие нанокомпозиты на основе кремний-органических наночастиц как антигипертензивные агенты

Левина А.С.[1], Репкова М.Н.[1], Исмагилов З.Р.[2], Маркель А.Л.[3], Зарытова В.Ф.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт катализа СО РАН, Новосибирск, Россия*
[3] *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

Кремниевые наночастицы могут быть транспортерами фрагментов нуклеиновых кислот в клетки. Подходы, разработанные при создании нанокомпозитов на основе TiO_2-наночастиц [1] использованы для получения кремний-содержащих нанокомпозитов. Коммерческие SiO_2-наночастицы разных типов (силанизированные, с эпокси- и аминогруппами) послужили основой для иммобилизации олигонуклеотидов. Показано, что исходные наночастицы малотоксичны для клеток, и полученные нанокомпозиты проникают в эукариотические клетки. Недостатком коммерческих наночастиц является их склонность к агломерации.

Разработан метод синтеза неагломерированных наночастиц аминосиланола ($Si{\sim}NH_2$). При электростатической фиксации олигонуклеотидов (ODN) на этих наночастицах образованы нанокомпозиты $Si{\sim}NH_2{\pm}ODN$, охарактеризованные физико-химическими методами [2].

На модельной системе гипертензивных крыс НИСАГ показано, что нанокомпозиты $Si{\sim}NH_2{\pm}ODN$ могут быть использованы как антигипертензивные агенты. Получены нанокомпозиты с олигонуклеотидами, направленными на мРНК генов, ответственных за развитие гипертензии: гена АТ1, гена бета-1-адренорецепторов и гена АПФ. Исследованы различные способы введения нанокомпозитов в организм крыс. Понижение (на 10-20 мм рт. ст.) систолического артериального давления (АД) происходит на 3-4 день при внутривенном введении полученных нанокомпозитов. Наиболее эффективными способами воздействия на АД оказалось внутрибрюшинное или ингаляционное введение и внутривенное, что обеспечило понижение систолического АД на ~30 мм рт. ст. в первую неделю [3]. Использование нанокомпозитов, несущих ODN со случайной последовательностью не дает заметного эффекта.

1. *Levina A., Repkova M., Ismagilov Z., Shikina N., Malygin E., др. всего 10 человек. High-performance method for specific effect on nucleic acids in cells using TiO2~DNA nanocomposites // Sci. Rep. - 2012. - V. 2. - P. 756.*
2. *Levina A., Repkova M., Shikina N., Ismagilov Z., Yashnik S., др. всего 10 человек. Non-agglomerated silicon-organic nanoparticles and their nanocomplexes with oligonucleotides: Synthesis and properties // Beilstein J. Nanotech. - 2018. - V. 9(1). - P. 2516–2525.*
3. *Левина А., Репкова М., Климов Л., Рязанова М, Маркель А, Зарытова В. Антисмысловые олигонуклеотиды, связанные с кремний-органическими нано-частицами, как инструмент длительной коррекции гипертензивных состояний // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 2019. - Т. 167 (1).- С. 125–128.*

Исследование было поддержано грантами РФФИ № 18-15-00133 и РНФ № 16-15-10073 и Проектом Базового бюджетного финансирования «Терапевтические нуклеиновые кислоты» (VI.62.1.3, 0309-2016-0005).

Влияние физико-химических условий на инфекцию клеток Burkholderia бактериофагом AMP1

Летаров А.В.[1,2], Иванов П.А.[1], Летарова М.А.[1], Галев Э.Е.3, Морозов А.Ю.[4], Clokie M.R.J.[4]

[1] *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия*
[2] *Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва Россия*
[3] *Department of Genetics, University of Leicester, Leicester, UK*
[4] *Department of Mathematics, University of Leicester, Leicester, UK*

Заболеваемость мелиоидозом (*Burkholderia pseudomallei*) представляет собой существенную проблему здравоохранения в тропических регионах, эндемичных по данной инфекции, например, в северо-восточном Таиланде. Существует также риск возникновения природных очагов мелиоидоза в России в следствие глобального потепления.

Природным местообитанием *B. pseudomallei* является почва, а также вода, в особенности – вода рисовых чеков. При этом экологические факторы и механизмы, влияющие на уровень риска инфекции и обуславливающие ее сезонную динамику, которая может существенно различаться даже в географически и климатически близких провинциях (например, в СВ Таиланде), плохо изучены. В эндемичных районах в почве встречаются специфичные к *B. pseudomallei* бактериофаги. Доминирующей группой оказались подовирусы, близкородственные фагу AMP1. Эти фаги инфицируют также и *B. thailandensis*, что позволяет исследовать их без специальных мер предосторожности. Фаг AMP1 эффективно лизирует клетки хозяина при 37°C, однако при 25 °C размножение фага подавлено (CS-фенотип). Для анализа механизмов данного эффекта мы получили серию CT-мутантов фага, у которых эффективность посева при 25 °C составляет более 0,1. Геномный анализ CT-мутантов обнаружил, что холодочувствительный фенотип фага связан не с недостатком какой-либо функции вируса или хозяина при низкой температуре, но является результатом действия кодируемого вирусом механизма. Нам удалось идентифицировать два гена, вовлеченных в контроль CS-фенотипа – ORF3 и ORF14. Интересно, что экспрессия ORF3 с плазмиды не супрессирует CT мутации, но наоборот индуцирует CT фенотип у фага дикого типа. В настоящее время мы исследуем эффект транс-комплементации с ORF14.

В ходе наших экспериментов мы обнаружили также другой экологически значимый эффект – зависимость инфекции фагом AMP1 от концентрации NaCl. Эта зависимость имеет достаточно резкий характер: при концентрации соли менее 0,2% рост фага полностью подавлен, а при 0,4% эффективность посева уже более 0,01. В отличие от CS фенотипа, чувствительность к низкой концентрации соли связана с подавлением инфицирования клеток, а не внутриклеточного развития фага. Мутации, снижающие пороговую концентрацию соли, локализованы в гене дистального белка трубки хвоста. Эффект зависимости инфекции от концентрации соли был нами подтвержден также на культуре *B. pseudomallei* в качестве хозяина. Эти результаты указывают на возможную связь природного биологического контроля возбудителя мелиоидоза фагами с засоленностью почв.

Изменение синтеза стафилоксантинов у штаммов Staphylococcus Aureus Str 402 и Staphylococcus Aureus Str 515 под давлением вирулентного бактериофага A515

Летарова М.А.[1], Тычина Е. П.[4], Корниенко М.В.[3], Летаров А.В.[1,2]

1 Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия
2 Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
3 ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА РФ, Москва, Россия
4 РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Введение

Одним из факторов вирулентности *Staphylococcus aureus* является стафилоксантин – золотистый пигмент, биосинтез которого кодируется кластером из 5 генов. Кроме этого существует множество факторов, влияющих на количество вырабатываемого стафилоксантина, таких как SigB, IspA, CitZ, CitB, CcpE, и AirR некоторые из которых также связывают с вирулентностью S. aureus.

Материалы и методы

Мы получили стабильно перевиваемые (псевдолизогенные) ассоциации вирулентного Twort-подобного фага A515 для двух клинических изолятов *S. aureus* – #402 и #515 (PA402 и PA515 соответственно). Ассоциации получены путем переноса материала из фаговых бляшек на новую чашку с LB. Эти ассоциации провели через 22 пассажа (поколения). Для каждой пары фаг-хозяин проанализировали 16 ассоциаций. Полученные ассоциации проверяли на содержание бактериофага, способного к росту на газоне исходных штаммов-хозяев. Для определения содержания стафилоксантина и интермедиатов его синтеза определяли спектры флуоресценции метанольных экстрактов биомассы.

Результаты

К седьмому поколению (пассажу) из 16 ассоциаций PA402 только 5, содержали бактериофаг, способный формировать зоны лизиса на газоне исходного штамма. В последующих поколениях их число не менялось. Оставшиеся 11 ассоциаций также содержали дериваты бактериофага A515, но их бляшки можно было наблюдать только на газонах некоторых субклонов соответствующих ассоциаций. Ассоциации PA515 вели себя аналогично, но в этом случае способность к росту на исходном штамме сохранили фаги в 9 ассоциациях из 16.

Мы заметили, что культуры ассоциаций отличаются по цвету от исходного штамма и друг от друга. По две ассоциации каждого типа были исследованы на содержание стафилоксантинов. В исходных штаммах 402 и 515 синтез пигмента не доводится до конца и останавливается на том или ином интермедиате. В одной из исследованных культур PA402 стафилоксантин не был найден вообще, а в другой напротив, биосинтез доведен до конца. При этом содержание стафилоксантина на одну клетку возрастало на 20% с седьмого поколения до одиннадцатого и на 7% с одиннадцатого до восемнадцатого, а затем оставалось неизменным. Для ассоциаций PA515, как и в случае PA402, в одной из ассоциаций биосинтез был завершен, а в другой стафилоксантин обнаружить не удалось. Однако, возрастания количества пигмента в ряду пассажей не наблюдалось.

Заключение

Отбор бактерий в коэволюционирующей системе фаг-хозяин приводит к радиации свойств стафилококков в том числе по клинически релевантным признакам, не связанным очевидным образом с взаимодействиями с вирусом.

Изоформы люциферазы Metridia как высокочувствительные биолюминесцентные репортеры для биомедицинских исследований

Маркова С.В.[1,2], Ларионова М.Д.[1], Высоцкий Е.С.[1]

[1] *Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия*
[2] *Сибирский Федеральный Университет, Красноярск, Россия*

Сфера применения биолюминесцентных белков в качестве репортеров в биологических и биомедицинских исследованиях в настоящее время постоянно расширяется благодаря бурному развитию фоторегистрирующей техники и расширению спектра таких репортеров. Небольшая секретируемая люцифераза морских копепод *Metridia longa*, катализирующая простую реакцию окисления субстрата целентеразина с излучением голубого света без каких-либо кофакторов является одним из привлекательнейших кандидатов в биолюминесцентные репортеры [1]. Данная люцифераза в геноме *M. longa* представлена как минимум четырьмя неаллельными изоформами различной длины 16.5-22.0 кДа. Все известные изоформы имеют высокую люминесцентную активность и высокую стабильность, в том числе термостабильность, но различаются некоторыми свойствами, в том числе кинетикой и температурным оптимумом биолюминесцентной реакции, что позволяет выбрать оптимально подходящий репортер для конкретного эксперимента.

Потенциалом для существенного улучшения репортерных свойств люцифераз *M. longa* является преодоление таких недостатков как низкий температурный оптимум в районе 15-18°C и голубой спектр эмиссии с пиком ~485 нм, интенсивно поглощаемый животными тканями. Кроме того, быстрая биолюминесцентная реакция по типу «вспышка» затрудняет использование этих репортеров в некоторых методах, особенно для высокопроизводительного скрининга. В рамках усовершенствования репортерных свойств люциферазы Metridia путем использования случайного мутагенеза и молекулярной эволюции нами получены новые мутантные формы с увеличенной активность, повышенным и расширенным температурным оптимумом реакции, близким к температуре теплокровных организмов, а также мутанты с медленной кинетикой биолюминесцентной реакции и небольшим спектральным сдвигом 10-15 нм в красную часть спектра для повышения проницаемости животных тканей. Показано, что больший спектральный сдвиг для люцифераз *M. longa* возможно получить, отбирая мутантные формы, способные использовать модифицированный «красный» целентеразин.

Перспективы применения новых репортеров в качестве биолюминесцентных репортеров в различных приложениях обсуждаются.

1. *Markova S. V., Larionova M. D., Vysotski E .S. Shining light on the secreted luciferases of marine copepods: current knowledge and applications. // Photochem. Photobiol. - 2019. - V. 95. – P. 705-721.*

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ – грант № 18-44-242001, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта: «Конструирование универсальных биолюминесцентных меток для иммунного и гибридизационного анализов на основе люцифераз копепод».

Противоопухолевые бесклеточные вакцины на основе маннозилированных липосом, специфичных к лектиновым рецепторам, и мембранных везикул, полученных при помощи цитохалазина В из дендритных клеток

Миронова Н.Л., Марков О.В., Ощепкова А.Л., Сенькова А.В., Зенкова М.А.

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

Вакцины на основе дендритных клеток (ДК) давно рассматриваются в качестве перспективных препаратов для лечения опухолей. Однако приготовление вакцин на основе ДК связано со многими трудностями, такими как длительное хранение клеток, проблемой стандартизации и нестабильностью клеточных вакцин. Для решения этих проблем в настоящее время разрабатывают новые бесклеточные противоопухолевые вакцины, адресованные в антиген-презентирующим клеткам или Т-клеткам.

В данной работе мы исследовали два типа бесклеточных вакцин на основе (1) маннозилированных липосом (МЛ), адресованных к лектиновым рецепторам антиген-презентирующих клеток (в частности, ДК) и (2) мембранных везикул (МВ), полученных с помощью цитохалазина В из дендритных клеток линии tsDC, нагруженных МЛ. Все бесклеточные вакцины несли в своем составе опухолеспецифическую РНК.

МЛ были сконструированы на основе поликатионного липида 2Х3 (1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид), липида-хелпера DOPE (1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин) и маннозилированного липоконъюгата (3-[6-(α-D-маннопиранозилокси)гексил]амино-4-{6-[rac-2,3-ди(тетрадецилокси)проп-1-илоксикарбониламино]гексил}аминоциклобут-3-ен-1,2-дион), взятых в молярном соотношении 3:6:1. Бесклеточные вакцины получали нагрузкой МЛ РНК меланомы В16 мыши или РНК резистентной лимфосаркомы RLS40 мыши. МВ получали путем обработки ДК костно-мозгового происхождения мыши или клеток tsDC, нагруженных МЛ в комплексе с опухолевой РНК, цитохалазином В.

Исследование эффективности праймирования противоопухолевых ЦТЛ *in vivo* под действием бесклеточных вакцин на основе МЛ или МВ, нагруженных РНК В16, показало, что наиболее эффективное праймирование противоопухолевых ЦТЛ происходит под действием цитохалазин В-индуцированных МВ.

Исследование эффективности запуска противоопухолевого иммунного ответа на модели лимфосаркомы RLS_{40} мыши под действием бесклеточных вакцин показало, что вакцины на основе МЛ или МВ, нагруженных РНК RLS_{40}, обладают высоким противоопухолевым потенциалом, сопоставимым по эффективности с классическими ДК-вакцинами.

Таким образом, полученные данные обеспечивают основу для разработки новых эффективных иммунотерапевтических подходов, позволяющих перейти от противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток к бесклеточным вакцинам на основе таргетных липосом или внеклеточных везикул дендритно-клеточного происхождения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210024-8 и грантов РФФИ № 17-04-01136 и № 17-04-00999.

Бактериальные везикулы как основа для создания искусственной клетки

Матюшкина Д.С.*, Бутенко И.О., Алехина О.М., Говорун В.М.

ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия

Активно развивающаяся область синтетической биологии позволяет не только изучать, модифицировать, но и создавать новые микроорганизмы. Одной из наименее изученных проблем синтеза новых биологических систем является проблема организации и синхронизации работы метаболических (ферментативных) систем. С помощью синтетических метаболических контейнеров можно будет создать минимальную живую единицу и определить ключевые звенья, необходимые создаваемой системе для поддержания ее гомеостаза и функционирования. В связи с этим, целью данного проекта был анализ мембранных везикул, естественно продуцируемых Грам-положительными бактериями, представляющие собой наноразмерные липид-двухслойные везикулярные структуры, несущие в своем составе определенный набор биоактивных белков, липидов, нуклеиновых кислот и метаболитов, которые обеспечивают стабильность данных «контейнеров» и могут являться тем необходимым минимальным набором компонентов для воссоздания искусственной клетки. В качестве донора везикул была выбрана бактерия *Acholeplasma laidlawii* (класс Mollicutes), характеризующаяся отсутствием клеточной стенки, а наличие дефекта в DCW-кластере способствует асинхронному делению и образованию большого количества везикул. Процесс выделения данных структур осуществлялся с помощью ультрацентрифугирования в градиенте перколла. Размер и стабильность выделяемых мембранных везикул была оценена с помощью микроскопии (световая, атомно-силовая). Качественный и количественный белковый состав были проанализированы с помощью метода ВЭЖХ-МС. По результатам проведенных экспериментов была осуществлена каталогизация состава природных «контейнеров», что в дальнейшем существенно упростит поиск оптимального минимального состава, необходимого для воссоздания искусственной жизни в лабораторных условиях.

Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-08041 «Создание стабильных метаболических контейнеров для воспроизводства искусственного генома».

* *E-mail: d.matyushkina@gmail.com*

Фотоиндуцируемая модификация поверхности ПЭТ пленки с оценкой концентрации карбоксильных групп методом флуоресцентной микроскопии

Мифтахов Р.А., Чудинов А.В.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

Биосенсоры, основанные на методе флуоресценции, играют важную роль в области биомедицинской диагностики. Несмотря на высокую чувствительность флуоресцентных методов регистрации, чувствительность метода биочипов часто ограничивается низким уровнем сигнала из-за малой концентрации биомолекул на поверхности подложки. В данной работе предложен метод повышения поверхностной концетрации функциональных групп на полимерной подложке.

Разработан ряд физико-химических методов изменения поверхностных свойств полимерных подложек, ковалентной иммобилизацией полимерных цепей на поверхность подложки фотоиндуцируемой реакцией полимеризации, лазерным облучением, обработкой плазмой или коронным разрядом.

Модификация поверхности подложки фотоиндуцируемой реакцией полимеризации не нарушает поверхностные свойства массива полимера, позволяет проводить прививку полимера на ограниченные области подложки через фотомаску. В качестве подложки для биочипов может использоваться полиэтилентерефталат (ПЭТ), который прочен, термостоек, совместим с компонентами, используемыми при анализе ДНК и белков, пригоден для фотопрививки полимерных цепей.

В данной работе проводили модификацию поверхности ПЭТ пленки методом фотоиндуцируемой полимеризации акриловой кислоты. Для полимеризации использовали раствор акриловой кислоты и бензофенона в ацетоне. Прививку полимера проводили УФ-облучением через кварцевую маску с ячейками размером 100*100 микрон и шагом 300 мкм. Карбоксильные группы полимера привитого к поверхности ПЭТ активировали раствором дисукцинкарбоната в ДМСО, связывали с аминосодержащим производным красителя Cy5. Концентрация карбоксильных групп в ячейках, оцененная методом флуоресцентной микроскопии по методу [1], составляла 129,1 пмоль/см^2, что существенно выше получаемой при щелочном гидролизе поверхности ПЭТ (8,06 пмоль/см^2).

В ячейках с активированными карбоксильными группами иммобилизовали олигонуклеотиды с С6-аминомодификатором. Провели гибридизационный анализ продуктов ПЦР маркированных красителем Cy5, с регистрацией сигналов в свете флуоресценции красителя. Оценка гибридизационных сигналов и дискриминационных отношений совершенных дуплексов к несовершенным показала пригодность ПЭТ-пленок с фотопривитыми полимерными цепями в качестве подложки для изготовления ДНК биочипов.

1. *Мифтахов Р.А., Лапа С.А. и др. Получение активных карбоксильных групп на поверхности полиэтилентерефталатной пленки и количественный анализ этих групп с помощью цифровой люминесцентной микроскопии //Биофизика (2018), Т. 63, № 4, С. 661-668.*

Работа выполнена при финансовой поддержке граента РФФИ 17-04-02062а.

Гистон-гидролизующая активность антител крови в патогенезе рассеянного склероза

Михеева Е.В., Баранова С.В., Невинский Г.А.

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

Рассеянный склероз (РС) – аутоиммунное, прогрессирующее заболевание центральной нервной системы, характеризуется очагами воспаления и демиелинизации с формированием вторичной диффузной дегенерации. Несмотря на большое число исследований, посвященных патогенезу РС, механизмы его развития неясны. Появление аутоантител с различными каталитическими активностями (абзимов) – ранний признак развития аутоиммунных заболеваний. Гистоны в высокой концентрации токсичны для клетки, а уменьшение их количества способствует повреждению ДНК.

В крови больных РС содержатся аутоантитела против гистонов. Изучено 59 препаратов антител крови пациентов из госпиталей г. Новосибирска, Томска и Красноярска. Показано, что 73% IgG эффективно расщепляют от одного до пяти гистонов, из них 84% гидролизуют гистон H1, 74% – гистоны H2A, H2B и H4, и 88% – H3. Обнаружено, что 5% препаратов IgG расщепляют только один гистон, 59% – все пять, а 28% – от двух до трех субстратов, в то время как 8% гидролизуют четыре разных гистона. Показано, что каталитическая активность принадлежит антителам, а не каким-либо примесям возможных совыделяющихся белков.

По характеру течения РС больные разделены на три группы: первая – вторично-прогрессирующий рассеянный склероз (ВПРС), вторая – ремиттирующий и ремиттирующе-прогрессирующий РС, третья – с дебютом. Показано, что у 90% больных с ВПРС IgG гидролизуют от 1 до пяти гистонов, во второй группе этот показатель меньше – 67%, а в дебюте – 100%. 33 пациента находились в стадии ремиссии (полной или частичной) и 26 при обострении. Активность антител крови из этих групп различна. Показано, что 92% препаратов антител пациентов в стадии обострения эффективно расщепляют от одного до пяти гистонов, а в стадии ремиссии только 30%. Различий в способности гидролизовать гистоны у пациентов в стадии полной и частичной ремиссии не обнаружено. Длительность болезни во всех группах от нескольких месяцев до 23 лет. От длительности заболевания менялась и способность расщеплять гистоны, так в дебюте 100% препаратов антител обладают гистон-гидролизующей активностью. При увеличении стажа заболевания этот показатель менялся и составил 60% и 82% при длительности РС до 5 и 6-10 лет соответственно. После 10 лет течения болезни способность антител гидролизовать гистоны снижалась и определялась у 75% больных г. Новосибирска и г. Томска и у 17% больных из г. Красноярска.

Определение гистон-гидролизующих антител может быть использовано в качестве дополнительного критерия диагностики и прогнозирования течения РС. Полученные результаты могут быть использованы для исследования патогенетической роли и диагностического значения абзимов и при других аутоиммунных заболеваниях.

Работа поддержана грантом РНФ № 19-15-00145, Проектом ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210023-1.

Разработка стратегии CRISPR/Cas9 опосредованного нокаута генов *IRF7* и *IFITM3* для получения пермиссивной клеточной линии к вирусу гриппа А

Можаева Е.В.[1,2], Ещенко Н.В.[1], Журавлев Е.С.[1], Сергеева М.В.[1,3], Комиссаров А.Б.[1,3], Степанов Г.А.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*
[3] *Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

Вирус гриппа А является респираторным патогеном и периодически вызывает эпидемии у людей, а также свиней, птиц и других животных. Отличительной чертой данного вируса является его изменчивость как в антигенности, так и в патогенности. В настоящее время во всем мире для защиты населения от инфекции вирусом гриппа используют инактивированные и субъединичные формы вакцин, полученные с использованием куриных эмбрионов. Применение культур клеток в производстве вакцин позволит существенно упростить технологический процесс и сделает его более быстрым и экономичным.

В ходе настоящей работы была разработана общая стратегия направленного нокаута генов врожденного иммунного ответа с применением технологии CRISPR/Cas9 геномного редактирования для создания клеточных линий на основе клеток 293FT, пермиссивных к различным штаммам вируса гриппа. В качестве мишеней были выбраны гены *IRF7* и *IFITM3*, продукты которых участвуют в регуляции репликации вируса гриппа А.

Общая стратегия нокаута генов включала:

1. Подбор и конструирование специфичных протоспейсеров к последовательностям выбранных генов при помощи «CRISPR Design Tool» – «Broad Institute GPP», (https://zlab.bio/guide-design-resources)
2. Получение плазмидных конструкций на основе вектора pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458), несущие необходимые протоспейсеры
3. Нокаут генов-мишеней путем введения точечных разрывов системой CRISPR/Cas9, закодированной в вектор pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)
4. Получение моноклонов с последующим отбором тех, что содержат мутации, обеспечивающие сдвиг рамки считывания
5. Оценка уровня жизнеспособности полученных клеток с помощью анализа скорости роста системой xCELLigence (ACEA Bioscience, США)
6. Анализ уровня экспрессии генов в модифицированных клонах при помощи методов ОТ-ПЦР и Вестерн-блот
7. Оценка проницаемости вируса в модифицированные клетки путем титрования в высоко пермиссивной клеточной линии MDCK и проточной цитофлуориметрии.

В результате нашей работы были получены клоны, несущие мутации в генах *IRF7* и *IFITM3*. Показано, что подавление экспрессии гена *IRF7* приводит к повышению скорости роста клеток 293FT относительно немодифицированной культуры. Оценка продуктивности наработки модельного вируса гриппа показала, что подавление экспрессии выбранного гена в мутантных клетках обеспечивает повышение продукции вируса гриппа А.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №18-75-10069).

Разработка универсальной бесклеточной платформы на основе *E. coli* для продукции сложных пептидов и белков

Wu Y.[1], Cui Z.[1], Alexandrov K.[1], Аралов А.В.[2], Мureев С.В.[1]

1 Queensland University of Technology, Brisbane, Australia
2 Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Москва, Россия

Терапевтический потенциал лекарственного препарата определяется его селективностью, биодоступностью и способностью проникать к очагу болезни. Низкомолекулярные препараты характеризуются высокой тканевой проницаемостью, но сильно уступают в селективности и стабильности белковым вакцинам, завоевывающим популярность в свете последних достижений иммунотерапии. Препараты на основе коротких пептидов способны объединить выгодные фармакологические свойства низкомолекулярных лекарств и вакцин в силу малого размера и определенных физико-химических свойств. Как показывают исследования, рационально вычислить такие свойства, равно как и реализовать их без использования неканонических аминокислот практически невозможно. Во многом поэтому, несмотря на продолжительные и затратные исследования, рынок существующих пептидных препаратов исчерпывается лишь природными представителями. В последние десять лет технологический уклад изменяется в сторону *de novo* селекции пептидных макроциклов против молекул-мишеней путем скринирования огромных комбинаторных библиотек *in vitro*. Нерентабельность прежнего и сложность нового подхода привели к спаду в новых разработках при повышении спроса на уже имеющиеся рыночные препараты. Близкая ситуация наблюдается и в сфере белковых вакцин в силу рисков и дороговизны их разработки в культурах клеток млекопитающих. Альтернативные эукариотические системы проигрывают в продуктивности, тогда как бактериальные лимитированы низким выходом правильно свернутого белкового продукта, нестабильностью и ковалентной агрегацией цистеин-богатых пептидов. Универсальная бесклеточная система на основе *E. coli* для продукции сложных пептидов и белков могла бы удешевить и упростить весь технологический процесс.

В рамках данного проекта мы предлагаем концепцию универсальной бесклеточной платформы для продукции сложных (поли)пептидов включающих неканонические аминокислоты. В ее основе лежит сегрегация синтезируемых цепей через котрансляционного заякоривания на аффинной смоле, что повышает протеолитическую устойчивость, снижает агрегацию, а также открывает возможности для термодинамического контроля белкового созревания и быстрой очистки нативного продукта. В рамках данной работы мы предлагаем подход к преодолению “узких мест” бесклеточной трансляции создавая условия для реализации фундаментального принципа автономии биополимеров при котором последовательность направляет процесс свертки в определенную струкутру за биологически адекватное время в физиологических условиях при отсутствии внешних помех.

Авторы выражают благодарность Коршуну В.А. за отзывчивость, помощь в организации сотрудничества и консультацию.

Взаимодействие между PARP1 и его регуляторным белком YB-1 модулируется PAR

Науменко К.Н.[1,2], Алемасова Е.Э.[1], Лаврик О.И.[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) – это мультифункциональный белок, участвующий в целом ряде ключевых клеточных процессов. YB-1 – это ДНК и РНК связывающий белок, а также взаимодействующий с большим количеством белков. Связываясь с нуклеиновыми кислотами, YB-1 принимает участие во многих ДНК и мРНК-зависимых процессах, включая репликацию и репарацию ДНК, транскрипцию, сплайсинг и трансляцию мРНК. Было показано, что YB-1 обладает повышенным сродством к ДНК, содержащей апуриновые/апиримидиновые сайты, к ДНК, обработанной цисплатином, и к ДНК, содержащей неспаренные основания. Кроме того, было показано, что YB-1 взаимодействует с различными белками – участниками репарации, модулируя активность некоторых из них. В настоящее время YB-1 рассматривается как неканонический белок, участвующий в регуляции процесса эксцизионной репарации оснований (BER). Для YB-1, методом флуоресцентного титрования, была показана способность взаимодействовать с белком PARP1, ключевым регулятором системы BER. PARP1 – это белок, вовлеченный в процесс детекции разрывов ДНК с последующим синтезом поли(АДФ-рибозы), ковалентно присоединенной к белкам-акцепторам (в том числе к самой поли(АДФ-рибозо) полимеразе), что приводит к более эффективной диссоциации белков из комплекса с ДНК. В системе *in vitro* была показана возможность поли(АДФ-рибоз)илирования YB-1 ферментом PARP1 и установлено, что YB-1 способен стимулировать активность PARP1. Кроме того, поли(АДФ-рибоза) способна вытеснять YB-1 из комплекса с одноцепочечной и двухцепочечной ДНК. Тем самым, можно предположить, что PAR, синтезируемый в процессе поли(АДФ-рибоз)илирования, может влиять на функциональные взаимодействия между YB-1 и PARP1. Нами было показано, что присутствие PAR в реакционной смеси может способствовать взаимодействию YB-1 и PARP1, приводя к увеличению выхода реакции поли(АДФ-рибоз)илирования. Напротив, постепенное увеличение концентрации PAR в реакционной смеси приводит к снижению количества продуктов поли(АДФ-рибоз)илирования вследствие функционального разобщения PARP1 и YB-1.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00481.

Изучение структурных и агрегационных свойств фрагмента к-казеина RL2

Овчеренко С.С.[1], Шернюков А.В.[1], Чинак О.А.[2], Багрянская Е.Г.[1]

[1] *Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Фрагмент человеческого к-казеина – RL2 способен проникать в человеческие клетки и, взаимодействуя с белками цитоскелета (α- и β-тубулином и α-актинином I), индуцировать апоптотическую смерть раковых клеток. На основе RL2 был разработан терапевтический агент «Лактаптин», доклинические испытания которого были успешно завершены.

Казеины относят к IDP, белкам с неупорядоченной структурой, для которых существуют специальные методы исследования. Одним из наиболее информативных методов высокого разрешения является метод ЯМР [1]. Мы исследуем фрагмент человеческого к-казеина – рекомбинантный белок RL2, который содержит 66.5% его аминокислотной последовательности (положение аминокислот 24-134) и дополнительно содержит His-tag - GGSHHHHHH на С-конце и метионин на N-конце.

В настоящей работе структурные и агрегационные свойства рекомбинантного белка RL2 были охарактеризованы комбинацией методов динамического светорассеяния (ДС), атомно силовой микроскопии (АСМ), ЯМР, а также ЭПР. Установлено, что в растворе RL2 присутствует в виде смеси отдельных мономеров с присоединенным по S-S связи к единственному остатку в полипептидной цепи 8Cys соединением - β-меркаптоэтанолом (BME), ковалентных димеров, образованных за счет S-S связи по 8Cys, и агрегатов большого размера. Была исследована динамика основной цепи RL2. Сопоставление полученных ЯМР данных позволяет выделить более упорядоченный участок основной цепи RL2 на N конце (1-43 остатки), который важен для цитотоксического действия RL2, а также область (30-41 остатки) со склонностью к образованию альфа-спирали. Установлено, что модификация 8Cys BME или MTSL-спиновой меткой значительно не влияет на структуру белка по сравнению с RL2 со свободным цистеином.

1. *Felli I. C., Pierattelli R. (ed.). Intrinsically disordered proteins studied by NMR spectroscopy. - Springer, 2015. - T. 870.*

Исследование было поддержано грантом - Министерство образования и науки Российской Федерации (state contract no. 14. W03.31.0034).

Изучение свойств проникновения фрагмента к-казеина RL2 внутрь клеток человека

Овчеренко С.С.[1], Шернюков А.В.[1], Чинак О.А.[2], Багрянская Е.Г.[1]

[1] *Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Белок RL2 – фрагмент человеческого к-казеина – способен проникать в человеческие клетки и индуцировать апоптотическую смерть раковых клеток. При изучении механизма цитотоксического действия RL2, было показано, что этот белок эффективно встраивается в цитоплазму человеческих раковых клеток частично через пиноцитоз, опосредствованный липидными рафтами, и частично через прямое проникновение через плазматическую мембрану [1]. По данным о механизме проникновения RL2 в клетки, а также по данным о его первичной структуре, RL2 можно отнести к классу CPP пептидов, которые известны своим свойством проникать внутрь клеток и внутриклеточно доставлять различные молекулы. Предположительно процесс проникновения CPP в клетку через клеточную мембрану зависит от их структурных свойств и способности переходить от неупорядоченного состояния к упорядоченному при взаимодействии с клеточной мембраной.

Недавно в лаборатории азотистых соединений НИОХ СО РАН была синтезирована спиновая метка NR1 m.w. 339.4; C17H27N2O5, обладающая высокой устойчивостью к процессам биовосстановления, что позволило методом ЭПР исследовать RL2 во внутриклеточном окружении.

В настоящей работе белок RL2 меченый NR1 по положениям Lys (RL2-NR1) был исследован методом ЭПР внутри клеток человека. Продемонстрирована возможность внутриклеточных ЭПР исследований, выполненных на основе NR1. После инкубации клеток в растворе RL2-NR1 в спектрах ЭПР образца клеток с RL2-NR1 обнаружены 3 компоненты, предположительно относящиеся к 3ем разным состояниям RL2-NR1. Результаты работы будут представлены на конференции.

1. *Chinak O, Fomin A, Nushtaeva A, Koval O, Savelyeva A, Kuligina E, Richter V. Penetration of the peptide lactaptin into human cancer cells. // Russian Journal of Bioorganic Chemistry – 2016. – T.42. – P 361-371.*

Исследование было поддержано грантом – Министерство образования и науки Российской Федерации (state contract no. 14. W03.31.0034).

Роль молекул внеклеточного матрикса в поддержании стволового состояния и дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток

Огнивцев А.А.[1,2], Калабушева Е.П.[1,3], Осидак Е.О.[4], Домогатский С.П.[4,5], Воротеляк Е.А.[1,2,3]

[1] *Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, Россия*
[2] *Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия*
[3] *Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия*
[4] *Биотехнологическая фирма «ИМТЕК», Москва, Россия*
[5] *Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии НИИ Клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова, Москва, Россия*

При изучении свойств плюрипотентных стволовых клеток больше внимания исходно уделялось изучению свойств растворимых факторов. Тем не менее, во многих исследованиях впоследствии было показано, что молекулы внеклеточного матрикса (ВКМ) также оказывают огромное влияние на судьбу клеток. Целью данной работы было исследование влияния компонентов ВКМ на поддержание плюрипотентного состояния и направленную дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека (линия Kyoto). В работе анализировали влияние следующих матриксов: коллагены I, III, IV, фибронектин, витронектин, ламинин.

В качестве контроля использовали матригель. Коллагены I и III не обеспечивали продолжительной адгезии ИПСК. Коллаген IV способствовал адгезии единичных колоний и обеспечивал поддержание их роста до 9 суток. Фибронектин был более эффективен в адгезии и поддержании роста колоний, однако к третьему пассажу скорость роста падала, снижалась экспрессия Sox2. Ламинин на первом пассаже демонстрировал результаты по поддержанию роста колоний сходные с контролем. К третьему пассажу наблюдали незначительное снижение скорости роста при сохранении высокой экспрессии Oct4 и Sox2. Витронектин не сорбировался на культуральном пластике с высокой адгезией, однако, при его нанесении на стекло, были получены сходные с контролем результаты по обеспечению роста колоний.

При проведении эпидермальной дифференцировки на всех исследуемых матриксах было отмечено сходное падение экспрессии маркера плюрипотентности Sox2 и повышение экспрессии эпидермальных маркеров: кератина 14, кератина 18 и p63. При нейральной дифференцировке на всех матриксах было выявлено снижение экспрессии Oct4 и повышение экспрессии нейральных маркеров: Pax6, β-tubulin-III и Nestin. Основные отличия между матриксами при проведении дифференцировок заключались в скорости роста колоний клеток. В обоих случаях лучшие результаты, близкие к контролю, были получены для ламинина и фибронектина.

На основании полученных данных можно предположить, что ламинин и витронектин способствуют поддержанию стволового состояния и пролиферации ИПСК. Также ламинин, фибронектин и коллаген IV оказались способны поддерживать ранние этапы эпидермальной и нейральной дифференцировок.

Работа была выполнена в соответствии с программой фундаментальных исследований ИБР РАН №010820190004.

Оценка размера фибрилл бета-амилоидного пептида с помощью динамического светорассеяния (DLS)

Орлов М.А.

Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФГБУН «ФИЦ ПНЦ БИ РАН», Пущино, Россия

Бета-амилоид (Abeta) представляет собой короткий пептид, имеющий длину около 40 пар аминокислотных остатков. Он является ведущим патологическим фактором наиболее распространенной формы нейродегенерации – болезни Альцгеймера. Abeta инициирует патогенез, в который далее вовлекаются изменения ассоциированного с микротрубочками тау-белка (MAPT), а также другие изменения в функционировании нейрона.

Abeta полиморфен, т.е. представлен в тканях мозга полипептидными цепями различной длины (важнейшими являются Abeta1-42 и Abeta1-40). При этом отдельные молекулы пептида могут объединяться как в нефибриллярные агрегаты, так и в фибриллы (характеризуются правильной периодичной структурой) различного размера, а также оставаться в олигомерной форме. Белок тау, в свою очередь, представлен связанной с микротрубочками формой, гидрофильной низкомолекулярной формой и относительно нерастворимой филаментной формой. Примечательно, что даже незначительного количества олигомерного (возможно также димерного) Abeta достаточно, чтобы запустить весь сложный патогенетический каскад.

В этой связи необходимо различать формы бета-амилоида, устанавливая их размер, молекулярную массу и фибриллярную либо нефибриллярную природу. Для установления размера и массы частиц белковой природы могут применяться различные биофизические методы, включая использованное нами динамическое светорассеяние (dynamic light scattering, DLS).

Молекулярные механизмы болезни Альцгеймера активно изучаются с использованием клеточных моделей, например, включающих культивирование в общей культуральной среде нейральных клеток и клеток-продуцентов токсических форм Abeta или тау-белка [1]. При работе с клеточными моделями также применяется синтетический бета-амилоид, в данном случае Abeta1-42. Для того, чтобы перевести препарат в фибриллярную форму, был использован протокол производителя, предусматривающий инкубацию при 37С на протяжении суток. Установлено, что подготовленный препарат бета-амилоидного пептида содержал исключительно крупные фибриллы (тысячи и десятки тысяч молекул). Олигомерные формы не выявлены. Ожидаемые биологические эффекты подобного препарата не могут быть велики, что мы и наблюдали при добавлении Abeta к нейрональной культуре. Вывод заключается в целесообразности использования генераторов ультразвука и других методов фрагментации фибрилл с целью получения наиболее активных олигомерных форм Abeta, а также последующей оценки размеров полученных частиц.

1. *Klenyaeva A. N., Chuprov-Netochin R. N., Marusich E. I. et al. Development of mouse fibroblast cell line expressing human tau protein and evaluation of tau-dependent cytotoxity // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology - 2014 - V. 8(3). - P. 232–239. https://doi.org/10.1134/s1990747814020111.*

Получение антител класса Y, нейтрализующих вирус геморрагической лихорадки Марбург

Полежаева О.А.[1,2], Щербаков Д.Н.[1], Зыбкина А.В.[1], Солодкий В.В.[1], Пьянков С.А.[1], Пьянков О.В.[1]

[1] *ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск, Россия*
[2] *ФГБОУ ВО Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Согласно международной классификации, вирус Марбург относится к семейству филовирусов отряд *Mononegavirales* [1]. Вирус Марбург вызывает тяжелую геморрагическую лихорадку у людей.

Наша работа направлена на разработку эффективной схемы иммунизации кур, для получения разнообразия IgY антител, нейтрализующего вирус Марбург. На первом этапе на основе рабдовирусной системы нами были получены функциональные вирусоподобные частицы (ВПЧ), псевдотипированные поверхностным гликопротеином (GP) вируса Марбург. Функциональную активность ВПЧ определяли на клетках HEK293T. Для получения нейтрализующих антител, кур иммунизировали девять раз с промежутком в три недели. Куры были разделены на две группы, в каждой по три птицы. Во время первых шести иммунизаций птицам вводили раствор, содержащий псевдовирусы экспонирующие на своей поверхности GP вируса Марбург без муциноподобного домена (штамм Popp) в концентрации 1.4x107 RLU. Во время следующих трех иммунизаций куриц прививали смесью лентивирусных псевдовирусов содержащие на своей поверхности GP вируса Марбург без муциноподобного домена (штамм DRC) и рабдовирусных псевдовирусов, использованных для первых иммунизаций, в соотношении 1:1. Первую группу животных иммунизировали смесью очищенных псевдовирусов внутримышечно. Вторую группу иммунизировали очищенными псевдовирусами в комплексе с неполным адъювантом Фрейнда. Желточные антитела – IgY, выделяли методом изоэлектрического осаждения. Наличие вирусспецифических антител было подтверждено при помощи ИФА. Скрининговые исследования вирусснейтрализующей активности проводили при помощи псевдовирусной системы. В результате были получены препараты антител, нейтрализующие ВПЧ в разведении 1/254. Анализ нейтрализующей активности в реакции ингибирования бляшкообразования с использованием натурального вируса Марбург штамм Popp (номер в коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» V 626), показал наличие нейтрализующей активности антител в титрах от 1/8 до 1/16.

1. *Sottofattori E., Anzaldi M., Mazzei M., Miele M., Balbi A., др. всего 8 человек. Synthesis and hybridization properties of the conjugates of oligonucleotides and stabilization agents. Part 3 // Bioorg. Med. Chem. - 2005. - V. 13. - P 1515–1522.*

Работа выполнена в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор' Роспотребнадзора, отделе биоинженерии, лаборатории иммунохимии при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-34-00512 мол_а.

Анализ статуса метилирования LINE-1 в крови больных со злокачественными и хроническими заболеваниями легкого

Пономарева А.А.[1], Добродеев А.Ю.[1], Бондарь А.А.[2], Чердынцева Н.В.[1,3], Тузиков С.А.[1], Власов В.В.[2], Лактионов П.П.[2,3], Рыкова Е.Ю.[2,5]

[1] *НИИ онкологии Томский НИМЦ, Томск, Россия*
[2] *ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия*
[4] *ТГУ, Томск, Россия*
[5] *НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия*
[6] *НГТУ, Новосибирск, Россия*

Актуальность. У больных с хроническими заболеваниями легкого (эндобронхит, ХОБЛ) и/или диспластическими изменениями эпителия существенно повышается риск развития РЛ. Признаком злокачественной трансформации является общее снижение уровня метилирования (гипометилирование повторяющихся элементов – LINE, Alu и др) и локальное увеличение уровня метилирования отдельных районов (гиперметилирование промоторов генов). При онкологических заболеваниях в составе циркулирующей ДНК (цирДНК) плазмы и цирДНК, связанной с поверхностью клеток крови (скп-цирДНК), накапливаются фрагменты опухоле-специфичных метилированных ДНК, которые являются потенциальными онкомаркерами.

Цель. Сравнительный анализ уровня метилирования LINE-1 повторов в цирДНК крови здоровых доноров, больных эндобронхитом и больных РЛ до и после противоопухолевого лечения.

Материалы и методы. Анализ уровня метилирования LINE-1 проводился методом количественной метил-специфичной ПЦР. Образцы крови получены от здоровых доноров (n=15), больных эндобронхитом (n=14), больных РЛ (n=16) до лечения, после 2 курсов предоперационной химиотерапии и резекции опухоли.

Результаты. Ранее показано, что фракция скп-цирДНК является более информативным источником материала для оценки статуса метилирования, по сравнению с цирДНК плазмы в связи с этим в настоящей работе проведено исследование уровня метилирования LINE-1 повторов в составе скп-цирДНК. В группе больных РЛ уровень метилирования LINE-1 в скп-цирДНК крови был ниже в 2,5 раза относительно группы здоровых доноров (p=0,02, критерий Манна-Уитни). Тогда как в группе больных эндобронхитом уровень метилирования LINE-1 значимо не менялся по сравнению со здоровыми донорами (p=0,29). В ходе анализа методом MANOVA выявлено значимое повышение уровня метилирования LINE-1 в скп-цирДНК у больных РЛ в ряду: до лечения – после химиотерапии - после операции (p=0,0009). Различия по значениям уровня метилирования LINE-1 в образцах после операции по сравнению с образцами до лечения были более выраженными (p=0,0026) в отличие от образцов после химиотерапии в сравнении с образцами до лечения (p=0,0193).

Результаты исследования говорят о перспективности исследования расширенной группы пациентов с хроническими заболеваниями легкого в динамике для определения тех значений уровня метилирования LINE-1, которые будут использованы как пороговые при дифференцировке больных раком легкого относительно больных неонкологическими заболеваниями и при выявлении рецидивов после лечения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-29-06002, стипендии Президента РФ №СП-1549.2018.4, 2018-2020 гг.

Выявление онкомаркерных и органоспецифичных РНК с использованием КНИ- биосенсора для диагностических целей

Порываева А.В.[1], Дмитриенко Е.В.[1],Семенов Д.В.[1], Ломзов А.А.[1], Купрюшкин М.С.[1], Зайцева Э.Г.[2], Иванощук Д.Е.[3], Николаев К.Ю.[3], Воевода М.И.[3], Пышная И.А.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск, Россия*
[3] *Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск,Россия*

Детекция и количественное определение РНК – важный и перспективный инструмент диагностики различных заболеваний. Стратегия использования диагностических маркеров на основе РНК является одной из самых успешных, так как именно данный класс соединений первыми попадают в кровь в ответ на возникновение отклонений и патологий.

Одним из лидирующих направлений диагностики на данный момент являются биосенсоры на основе КНИ-транзистора (Кремний На Изоляторе). Он представляет собой массив нанопроволок, длина которых от сотен до единиц нанометров, на подложке из оксида кремния. В основе принципа действия КНИ-биосенсора лежит модуляция проводимости в ответ на изменение окружения проволоки, а именно общего заряда и его экранирования. Чувствительность биосенсоров на основе полевых транзисторов достигает уровня 10^{-18} М [1]. Для обеспечения эффективности и чувствительности работы биосенсора с этой точки зрения перспективны незаряженные аналоги нуклеиновых кислот – фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды [2].

В рамках данной работы исследуется выявление с помощью КНИ-биосенсора фрагментов мРНК, ассоциированных с немелкоклеточным раком легкого, и мРНК белка тропонина, который выбрасывается в кровь в случае разрыва сердечной мышцы.

Сконструированы модельные системы, состоящие из пула нативных и модифицированных олигонуклеотидных зондов, комплементарных различным участкам, соответствующих маркерных РНК, а также модельных фрагментов РНК, несущих флуоресцентную метку. Исследованы физико-химические свойства полученных олигонуклеотидов и определены параметры формирования гибридизационных комплексов. Осуществлен поиск и оптимизация состояния поверхности для выявления РНК-маркеров. Разработаны протоколы иммобилизации зондов и гетерофазного выявления модельных матриц (индивидуальных и в составе смесей), ассоциированных с развитием заболеваний человека. С использованием КНИ-биосенсора продемонстрирована возможность выявления РНК-маркеров с чувствительностью до 10^{-15} М.

1. *Campos R., Borme J., Guerreiro J.F., Machado G. Attomolar label-free detection of DNA hybridization with electrolyte-gated graphene field-effect transistors //ACS sensors. – 2019.*
2. *Stetsenko D.A., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V. Modified oligonucleotides and methods for their synthesis // WO2016028187A1. Priority from 22.06.2014.*

Работа выполнена в рамках государственного задания 0309-2016-0004 и при поддержке проекта № 0309-2018-0017.

Разработка методов для выявления 2′-О-метилированных нуклеотидов в составе природных РНК

Прохорова Д.В.[1,2], Журавлев Е.С.[1], Можаева Е.В.[1,2], Касакин М.Ф.[1], Филиппова Ю.А.[1], Степанов Г.А.[1,2]

1 ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
2 Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Пост-транскрипционные модификации в составе некодирующих РНК играют значительную роль в регуляции обширного набора жизненно важных процессов в клетках. 2′-О-метилирование рибозы является одной из наиболее часто встречающихся модификаций РНК. В настоящей работе было предложено три усовершенствованных подхода для выявления 2′-О-метилирования отдельных нуклеотидов в составе протяженных РНК.

Первый метод основан на использовании 5′-флуоресцентно меченных праймеров с последующим анализом продуктов терминации обратной транскрипции на автоматическом ДНК-анализаторе [1] Предложенный подход позволяет одновременно выявлять модификации и проводить относительную оценку глубины 2′-О-метилирования нуклеотидов. Таким образом, можно получать более полную информацию о распределении модифицированных нуклеотидов в структуре протяженных участков (до 300-500 н.) РНК-матрицы. Второй подход представлен двухстадийной ОТ-ПЦР в режиме реального времени с «неоптимальной» как пониженной, так и повышенной (>1,0 мМ) концентрацией дНТФ на первой стадии, позволяющий определять глубину 2′-О-метилирования отдельных нуклеотидов в составе РНК-матрицы. Третий подход основан на применении фермента РНКазы Н с последующим ферментативным гидролизом и выявлением 2′-О-метилированных нуклеотидов с помощью метода ВЭЖХ МС-МС [2]. С использованием предложенных подходов были выявлены различия в глубине модификации нуклеотидов рРНК клеток человека, а также подтверждены изменения в глубине 2′-О-метилирования нуклеотидов 28S и 18S рРНК человека в клеточных линиях с нокаутом индивидуальных малых ядрышковых РНК. Дополнительно был разработан метод выявления 2′-О-метилированных нуклеотидов с использованием фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов.

Разработанные подходы расширяют возможности использования методов выявления 2′-О-метилированных нуклеотидов природных РНК в исследованиях путей регуляции модификации РНК.

1. *Филиппова Ю.А., Степанов Г.А., др. Модифицированный метод анализа структуры рРНК позволил выявить новые свойства аналогов C/D-бокс-РНК. // Acta Naturae - 2015. - V. 2. - P 69-78.*
2. *Филиппова Ю.А., Семенов Д.В., др. Современные методы выявления модифицированных нуклеотидов в РНК. // Биохимия - 2017. - V. 11. - P 1557 – 1576.*

Исследование выполнено при частичной поддержке проекта базового бюджетного финансирования Минобрнауки РФ (0245-2019-0001) и гранта РФФИ № 18-29-07073, на этапе разработки методов с применением фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов при поддержке гранта РНФ № 18-14-00357.

Сравнительное исследование влияния рекомбинантных форм гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, продуцируемых штаммами *Pichia pastoris*, на дифференцировку дендритных клеток

Пыхтина М.Б.[1], Романов В.П.[1], Леплина О.Ю.[2], Черных Е.Р.[2], Беклемишев А.Б.[1]

[1] *НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия*
[2] *ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия*

Препараты рекомбинантного ГМ-КСФ (рГМ-КСФ) человека используются в клинике для профилактики нейтропении и лечения нейтропенических инфекций. Однако короткий период полувыведения этих препаратов и наличие побочных эффектов существенно ограничивают применение рГМ-КСФ. В связи с этим, актуальной задачей является разработка новых форм лекарственных препаратов на основе рГМ-КСФ, обладающих пролонгированным действием и меньшей токсичностью.

Одним из способов повышения стабильности цитокинов является получение их в виде рекомбинантных химерных полипептидов, содержащих транспортные белки крови человека такие, как альбумин [1], трансферрин [2] и др. В данной работе были получены рГМ-КСФ и его химерная форма с аполипопротеином А-I (апоА-I) человека. Ожидалось, что введение апоА-I в состав химера позволит пролонгировать действие цитокина за счет длинного периода полужизни апоА-I в крови и его способности к естественному формированию ЛПВП, которые смогут дополнительно защитить молекулы цитокина.

Гены 2-х форм ГМ-КСФ были клонированы в клетках *P. pastoris* шт. X33. Отобранные клоны показали высокий уровень экспрессии и секреции обеих форм рГМ-КСФ. Очистку белков проводили ионообменной хроматографией на смолах DEAE BioPro Q75 и CM-сефарозе. Чистота препаратов составила ~ 95%. Биологическую активность цитокинов оценивали по способности индуцировать дифференцировку дендритных клеток (ДК), полученных из моноцитов путем культивирования адгезивной фракции мононуклеарных клеток с 40 нг/мл ГМ-КСФ и 1000 Ед/мл ИФН-α с последующим дозреванием в присутствии липополисахарида. Об эффективности генерации ДК судили по экспрессии маркеров моноцитов (CD14) и зрелых ДК (CD83), костимуляторных (CD86) и антигенпрезентирующих молекул (HLA-DR), а также способности ДК стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток. Контролем служил рГМ-КСФ, клонированный в *E. coli* (Sigma-Aldrich). Обнаружено, что полученные цитокины не уступали контрольному рГМ-КСФ по способности индуцировать дифференцировку и созревание ДК из моноцитарных предшественников.

1. *Halpern W., Riccobene T.A., Agostini H., и др. всего 11 человека. Albugranin, a recombinant human granulocyte colony stimulating factor (GCSF) genetically fused to recombinant human albumin induces prolonged myelopoietic effects in mice and monkeys. // Pharm. Res. - 2002. - V. 19. - P 1720–1729.*
2. *Heinzelman P., Priebe M.C. Engineering superactive granulocyte macrophage colony-stimulating factor transferrin fusion proteins as orally-delivered candidate agents for treating neurodegenerative disease. // Biotechnol. Prog. - 2015. - V. 31. - P 668–677.*

Олигонуклеотид-содержащие нанокомпозиты на основе аминосиланола для подавления репликации вируса гриппа А

Репкова М.Н.[1], Левина А.С.[1], Шикина Н.В.[2], Мазуркова Н.А.[3], Филиппова Е.И.[3], Зарытова В.Ф.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт катализа СО РАН, Новосибирск, Россия*
[3] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия*

Олигонуклеотид-содержащие нанокомпозиты на основе наночастиц аминосиланола Si~NH_2±ODN [1] использованы для подавления репликации вируса гриппа А (ВГА). Оценена токсичность (ТС50 10–20 мМ Si) полученных нанокомпозитов в клеточной системе. Нанокомпозит Si~NH_2±ODN в нетоксической концентрации, содержащий олигонуклеотид, направленный на 3'-некодирующую область вирусной (–)РНК 5-го сегмента ВГА (H5N1), ингибировал репродукцию вируса в клетках MDCK в 1000 раз. Наночастицы Si~NH_2 и нанокомпозит, содержащий контрольный олигонуклеотид со случайной последовательностью были практически неэффективны. Исследована дозозависимость противовирусной активности нанокомпозита Si~NH_2±ODN. Показано, что активность нанокомпозита зависит только от концентрации олигонуклеотида независимо от того, меняется ли емкость нанокомпозита по олигонуклеотиду при постоянной концентрации наночастиц, либо меняется концентрация наночастиц при постоянной емкости по олигонуклеотиду. Оценена величина индекса селективности Si~NH_2±ODN (500-1000), которая сравнима с таковой для нанокомпозитов на основе наночастиц диоксида титана [2]. Показана возможность использования предложенных нанокомпозитов на основе аминосиланола для подавления репликации вируса гриппа А в системе *in vivo* (на нелинейных мышах).

1. *Levina A., Repkova M., Shikina N., Ismagilov Z., Yashnik S., др. всего 10 человек. Non-agglomerated silicon-organic nanoparticles and their nanocomplexes with oligonucleotides: Synthesis and properties // Beilstein J. Nanotech. - 2018. - V. 9(1). - P. 2516–2525.*
2. *Levina A., Repkova M., Ismagilov Z., Shikina N., Malygin E., др. всего 10 человек. High-performance method for specific effect on nucleic acids in cells using TiO2~DNA nanocomposites // Sci. Rep. - 2012. - V. 2. - P. 756.*

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 18-15-00133 и Проектом Базового бюджетного финансирования «Терапевтические нуклеиновые кислоты» (VI.62.1.3, 0309-2016-0005).

Изучение потенциальных параметров оценки эффективности технологий направленной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток

Родимова С.А.[1], Реунов Д.Г.[1], Калабушева Е.П.[2], Дашинимаев Э.Б.[2], Мелешина А.В.[1]

[1] *НИИ ЭО и БМТ, Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия*
[2] *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия*

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) – перспективный инструмент клеточной терапии. ИПСК способны дифференцироваться в клетки всех типов тканей человека. Перспективным направлением является применение пациент-специфических ИПСК в клеточной заместительной терапии, где возможна предварительная коррекция аутологичного материала пациентов с врожденными заболеваниями на генетическом уровне, с последующей трансплантацией пациенту.

С появлением новых технологий индукции направленной дифференцировки ИПСК актуальной задачей становится поиск чувствительных параметров оценки эффективности дифференцировки. Такими параметрами могут выступать внутриклеточный pH и вязкость цитоплазматической мембраны.

В работе проведена направленная дифференцировка ИПСК в эпидермальном, нейрональном и эндотелиальном направлениях. В процессе дифференцировок ИПСК анализ pH производился с использованием pH-сенсора SypHer 2 и флуоресцентной микроскопии. Данные о вязкости цитоплазматической мембраны получены с использованием FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) по изменению времени жизни флуоресценции молекулярного ротора BODIPY.

В ИПСК значения pH составили 7.39±0.02 абсолютных единиц. В предшественниках кератиноцитов (ПрК) и кератиноцитах получены значения pH - 7.4 ±0.01 и 7.8 ±0.01 соответственно. В нейрональных стволовых клетках (НСК) значение pH составило 7.3±0.13, а в нейронах наблюдается сдвиг в щелочную сторону (7.4±0.13). В клетках первичной мезодермы (ПМ) и эндотелиальных клетках (ЭК) мы наблюдали значения pH равные 7.47±0.01 и 7.1±0.02 соответственно.

Вязкость мембраны в ИПСК составила 482.41±81.7 сПз. При эпидермальной дифференцировке наблюдали сдвиг в сторону уменьшения вязкости мембран (ПрК =384.04±83.73 сПз и кератиноцитах =331.58±83.4 сПз). В клетках ПМ и НСК детектировали снижение вязкости (305,9±45,08 и 340,9±94,09 сПз соответственно). В нейронах и ЭК наблюдали повышение вязкости мембраны (474,3±113,04 и 419,9±59,96 сПз соответственно). Значимые изменения, проявляющиеся на стадии предшественников наблюдались лишь по параметру вязкости цитоплазматической мембраны. Изменения данного параметра предшествовали изменению уровня поверхностных маркеров, что может быть более эффективным при оценке клеток, выходящих из плюрипотентного состояния.

Таким образом, оценка вязкостных свойств мембраны ИПСК с использованием высокотехнологичных подходов в дальнейшем может стать потенциальным параметром оценки эффективности технологий направленной дифференцировки ИПСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект №17-75-20178).

Исследование противовирусной активности химерной формы интерферона альфа-2б, слитого с аполипопротеином А-I человека

Романов В.П.[1], Пыхтина М.Б., Беклемишев А.Б.

[1] *НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия*

Препараты рекомбинантного интерферона альфа-2б (рИФН) человека широко применяются в клинической практике при лечении множества заболеваний, таких как гепатиты В и С, некоторые виды онкологических заболеваний, иммунодефицитные состояния. Однако системные побочные эффекты, связанные с использованием высоких лечебных доз рИФН, ограничивают его клиническое применение. Кроме того, короткий период полужизни рИФН в крови снижает его эффективность и биодоступность. В этой связи, разработка биологически активного рИФН с более длительным периодом полужизни, является актуальной задачей медицинской биотехнологии. Одним из способов повышения стабильности ИФН является создание химерного белка, состоящего из ИФН, слитого с белком плазмы крови [1, 2].

Целью данной работы являлось создание гибридного белка, состоящего из ИФН, «сшитого» с аполипопротеином А-I (апоА-I) человека, и исследование его противовирусной активности. АпоА-I обладает рядом ценных свойств, позволяющих улучшить фармакокинетику слитых с ним терапевтических белков, таких как относительно длинный период полужизни, отсутствие иммуногенности, а также способность к естественному формированию липопротеиновых комплексов в организме.

Гены ИФН и его слитой формы с апоА-I были оптимизированы, синтезированы и клонированы в клетках *Pichia pastoris* шт. X33. Полученные клоны продуцировали и секретировали рИФН и его химерную форму в культуральную жидкость. Очистку рИФН осуществляли с помощью ионообменной хроматографии на смолах с SP и DEAE-сефарозой. Очистку химерного белка ИФН-апоА-I проводили методом обращенно-фазовой хроматографии. Чистота полученных препаратов для рИФН и химера ИФН-апоА-I составила ~ 95% и ~ 90%, соответственно. Специфическую активность обеих форм рекомбинантного интерферона оценивали по их способности подавлять цитопатический эффект вируса везикулярного стоматита лошадей в клетках почек быка по сравнению со стандартным образцом интерферона. Установлено, что мономерная и химерная формы интерферона имели сравнимую удельную активность в пределах 1,5-1,3×108 МЕ/мг, что соответствует Европейской фармакопее. В дальнейшем планируется исследование фармакокинетических свойств полученного химерного белка ИФН-апоА-I.

1. *Huang Y.S., Chen Z., Yang Z.Y., Wang T.Y., Zhou L., др. всего 7 человек. Preparation and characterization of a potent, long-lasting recombinant human serum albumin-interferon-alpha2b fusion protein expressed in Pichia pastoris. Eur. J. Pharm. Biopharm. - 2007 - V. 67. - P 301–308.*
2. *Ji Z.X., Chen Y.N., Zhang Y.R., Yang Y.X., Wang C.R., др. всего 6 человек. Expression of recombinant human IFNa-2b/IgG4 Fc fusion protein in a baculovirus insect cell system. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. -2012. - V. 20. P 617–620.*

Разработка технологий для получения аутологичных кожных эквивалентов и кожных дериватов

Рябинин А.А., Калабушева Е.П., Воротеляк Е.А.

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

В настоящее время актуальной проблемой является разработка технологий выращивания и пересадки живых эквивалентов кожи (ЖЭК), которые применяются для лечения ожогов, хронических воспалений и иных повреждений покровных тканей. В перспективе, использование генетически модифицированных аутологичных клеток эпидермиса и дермы позволит формировать *in vitro* ЖЭК, пригодные для заместительной терапии пациентов с генетическими заболеваниями кожи. Одним из перспективных источников клеток для получения ЖЭК является дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых (ИПСК). К основным нерешенным проблемам данной технологии относятся отличие в структуре ЖЭК и его естественного аналога и отсутствие в нем кожных дериватов, участвующих в регуляции и самоподдержании кожного покрова.

Целью нашей работы было получение в ходе направленной дифференцировки ИПСК и верификация клеточных линий, пригодных для получения аутологичного ЖЭК и генерации кожных дериватов (волосяных фолликулов) *in vitro*. Полученные в ходе дифференцировки клеточные линии, аналог кератиноцитов (ИПСК-Кц) и аналог клеток дермальной папиллы волосяного фолликула (ИПСК-ДП) верифицировали при помощи иммуноцитохимического и количественного ПЦР выявления маркеров кератиноцитов (p63, K14, K18, K10 и др.) и маркеров клеток дермальной папиллы (версикана, виментина, фибронектина, гладкомышечного актина и др.) соответственно. Также для верификации ИПСК-ДП проводили функциональный тест на индукцию фолликулогенеза *in vivo* после введения ИПСК-ДП под кожу иммунодефицитных мышей линии nude с последующим иммуногистохимическим выявлением эпидермальных маркеров (K6 и K14), в составе сформированных *de novo* кожных органоидов в препаратах, полученных из зоны введения. На следующем этапе работы ИПСК-ДП и ИПСК-Кц использовали для получения ЖЭК в системе transwell и сфероидов, имитирующих ранние стадии фолликулогенеза, в системе «висячая капля». Образцы полученных препаратов использовали для иммуногистохимического выявления маркеров клеток дермальной папиллы (фибронектина и версикана), базальной мембраны (коллаген *IV*) и кератиноцитов (K*14*).

Полученные результаты подтверждают целевой фенотип у полученных клеточных линий и их способность к взаимной интеграции в трехмерные клеточные системы. Этот факт позволяет утверждать, что разработанные методы и полученные клеточные линии могут быть использованы для формирования полноценного ЖЭК с кожными дериватами *in vitro*.

Исследование было поддержано грантом РНФ №16-14-00204.

Влияние аденовирусов серотипов 5 и 6 на опухолевые стволовые клетки глиобластомы на примере культур U87 и U251

Сизова М.А.[1], Осипов И.Д.[1], Романенко М.В.[1], Нетесов С.В.[1], Риттер Г.С.[2], Долгова Е.В.[2], Богачев С.С[2]

[1] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

Злокачественные новообразования содержат множество разнообразных клеток, в частности, особую популяцию — опухолевые стволовые клетки (ОСК), которые ответственны за рост, метастазирование, устойчивость к радио- и химиотерапии, а также возникновение рецидивов заболевания. Одними из перспективных агентов, способных уничтожать как общую массу опухоли, так и ОСК, являются онколитические вирусы. Перспективными агентами для лечения людей с онкозаболеваниями являются аденовирусы, их высокий онколитический потенциал по отношению к клеткам глиобластомы (ГБ) был показан на примере аденовируса серотипа 5 (Ad5). Однако в связи с тем, что Ad5 имеет ряд недостатков (гепатотоксичность, предсуществующий иммунитет) актуальной задачей является изучение альтернативных серотипов.

В данной работе был изучен онколитический потенциал серотипа 6 (Ad6) на клетки глиобластомы в целом (*in vitro* и *in vivo*) и на ОСК в частности на примере культур U87 и U251. Основываясь на свойстве ОСК глиобластомы интернализовать флуоресцентно меченный двуцепочечный ДНК-зонд, методами конфокальной и флуоресцентной микроскопии оценены пространственное расположение, а также динамика изменения количества указанных клеток в течение терапии.

Показано, что Ad5 и Ad6 при заражении клеток U87 и U251 дозой 10 $ТЦПД_{50}$/клетку обладают цитотоксичностью *in vitro* ($p<0,01$). Внутриопухолевые инъекции Ad6 наравне с Ad5 приводят к достоверному ($p<0,01$) снижению объема и регрессии опухоли. Патоморфологический анализ опухолевых образцов показал более выраженную степень некроза в случае терапии Ad6 по сравнению с другими группами. Анализ ОСК выявил тенденцию к снижению их количества в группах, получавших терапию Ad5 и Ad6, по сравнению с контролем.

Полученные результаты подтверждают восприимчивость как общей массы опухолевых клеток, так и ОСК глиобластомы U87 к препаратам Ad5 и Ad6. Отсутствие полной элиминации ОСК говорит о том, что необходимы дальнейшие исследования и внесение дополнительных модификаций в геном вируса. Тем не менее, аденовирус 6 серотипа показывает себя как перспективный агент для применения в качестве онколитического препарата в отношении глиом.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-34-20016.

«Компартментализация» поврежденной ДНК, опосредованная взаимодействием РНК-связывающего белка FUS с поли(ADP-рибозой)

Сингатулина А.Ш.[1], Суханова М.В.[1], Хамон Л.[2], Бош А.[2], Пастре Д.[2], Лаврик О.И.[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Университет Эври-Валь-де'Эссонна, Эври, Франция*

Поли(ADP-рибозил)ирование белков является одним из самых быстрых клеточных ответов на повреждение ДНК. Поли(ADP-рибозо) полимераза 1 (PARP1) является одним из наиболее распространённых представителем семейства PARPs. PARP1 катализирует синтез поли(ADP-рибозы) (PAR), используя NAD+ в качестве субстрата. Каталитическая активность PARP1 индуцируется при связывании с поврежденной ДНК, в результате фермент синтезирует PAR полимер, ковалентно присоединенный к белку-акцептору. В клетке основной мишенью PARилирования является сама PARP1. Деградация PAR полимера осуществляется за счет ферментативной активности поли(АДФ-рибоза)гликогидролазы (PARG). Относительно недавно был идентифицирован ряд мРНК-связывающих белков, которые колокализуются с PARP1 на сайтах повреждения ДНК [1]. Полимер PAR имеет отрицательный заряд и может эффективно конкурировать с нуклеиновыми кислотами за связывание с РНК-связывающими белками, и регулировать их функцию. Белок FUS (fused in sarcoma) является одним из таких белков, которые наряду с белками репарации привлекается к сайтам повреждения ДНК при активации PARP1 и синтезе PAR полимера. В связи с этим возникает вопрос о возможной функции FUS в репарационном процессе.

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) было исследовано взаимодействие FUS с PAR полимером, синтезируемым PARP1 в районе сайта повреждения ДНК. Для исследования образования комплексов FUS с PAR на уровне отдельных молекул методом АСМ мы использовали реконструированную систему, содержащую, поврежденную и неповрежденную ДНК, мРНК, PAR полимер и белки (PARP1, PARG, FUS и его делеционные мутанты). Мы обнаружили, что FUS привлекается к сайтам повреждения ДНК посредством его связывания с PAR при активации PARP1, что индуцирует формирование мультимолекулярных комплексов, содержащих поврежденную ДНК. Было установлено, что неструктурированный домен (LCD) и РНК-связывающие домены (RGG) белка FUS играют ключевую роль в образовании мультимолекулярных комплексов и «компартментализации» поврежденной ДНК. Кроме того, было продемонстрированно, что PARG-зависимый гидролиз PAR приводит к разрушению этих комплексов и способствует высвобождению FUS. Мы предполагаем, что FUS стимулирует репарационный процесс, индуцируя временную «компартментализацию» повреждённой ДНК и «концентрирование» сайтов повреждения.

1. *Rulten S.L., Rotheray A., Green R.L., Grundy G.J., Moore D.A., Gomez-Herreros F., Hafezparast M., and Caldecott K.W. PARP-1 dependent recruitment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated protein FUS/TLS to sites of oxidative DNA damage. // Nucleic Acids Res. - 2014. - V. 42. - P. 307–314.*

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ (18-04-00882).

Структурные компоненты и биологические свойства мультибелкового стабильного комплекса молока человека

Соболева С.Е., Невинский Г.А.

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

Большинство биологических процессов осуществляется не индивидуальными белками, а различными многокомпонентными системами и белковыми комплексами. Известно, что мультиферментные комплексы являются совершенной организацией биохимических процессов в клетке. На данный момент показано, что в молоке и плаценте человека образуются высокомолекулярные белковые комплексы (~1000 кДа), которые остаются стабильным в присутствии соли в высокой концентрации. Биологические активности отдельных белков могут отличаться от активностей подобных комплексов, поэтому идентификация и характеристика структурных компонент и функциональных свойств белковых комплексов является важным шагом в исследовании различных биологических жидкостей человека, содержащих подобные комплексы. Целью данной работы являлось исследование структуры и биологических функций высокомолекулярного комплекса молока человека и составляющих его белков.

Показано, что кроме лактоферрина и других высокомолекулярных белков комплекс содержит большое число трудно разделяемых коротких белков и пептидов с молекулярными массами от 2 до 10 кДа. Впервые показано, что стабильный белковый комплекс молока человека обладает различными ферментативными активностями. Помимо показанных ранее ДНК-гидролизующей, амилолитической, протеолитической и фосфатазной белковый комплекс демострирует РНК- и АТР-гидролизующую, а также пероксидазную и каталазную активности. Проведен сравнительный анализ ферментативных активностей комплекса молока с активностями пяти белков, входящих в его состав. Показано, что удельные амилолитическая, перексидазная, ДНК- и РНК-гидролизующая активности белкового комплекса были сравнимы таковыми для иммуноглобулинов класса A и G, а также лактоферрина молока человека. Тогда как в реакции гидролиза казеина, АТР, перекиси водорода и пара-нитрофенилфосфата удельная активность данного комплекса на несколько порядков выше суммарных активностей составляющих его белков.

Таким образом, белковый комплекс молока человека обладает биологическими функциями, которые значительно превышают таковые для отдельных составляющих его белков. Вероятно, белки комплекса организованы в единую супрамолекулярную структуру, которая функционирует не просто как смесь белков, а как единый мультибелковый комплекс, обладающий уникальными функциями. Изучение структуры и свойств подобных комплексов позволит исследовать новые биологические функции, которые реализуются на супрамолекулярном уровне.

Работа поддержана грантом РНФ № 18-74-10055.

Анализ изменений транскриптома клеток гиппокампа крыс под воздействием пептидного препарата семакс в условиях острого стресса

Ставчанский В.В.[1], Филиппенков И.Б.[1], Дергунова Л.В.[1], Глазова Н.Ю.[1], Левицкая Н.Г.[2], Себенцова Е.А.[1], Хухарева Д.Д.[2], Лимборская С.А.[1], Мясоедов Н.Ф.[1]

[1] *Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*
[2] *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Поиск лекарств, способных противостоять негативному влиянию стресса на функции нервной ткани, – актуальная проблема молекулярной биологии и медицины. Препарат семакс (MEHFPGP) – аналог фрагмента АКТГ(4-10), эффективно улучшает когнитивные функции и умственную работоспособность при стрессе.

Цель данной работы – исследование воздействия семакса в условиях острого стресса на транскриптом клеток гиппокампа крыс. Работа выполнена на крысах-самцах Вистар массой 220-250 г., которые были поделены на 3 группы. За 30 мин до стресс-воздействия крысам группы «стресс-семакс» внутрибрюшинно вводили семакс (100 мкг/кг), животным групп «стресс-контроль» и «контроль» – воду. Животных группы «контроль» не подвергали стрессу. Стресс-воздействие включало иммобилизацию со световым и акустическим воздействием в течение 1ч. Для оценки уровня тревожности грызунов использовали тесты "приподнятый крестообразный лабиринт" и «О-образный лабиринт» спустя 1,5 и 4 ч после стресс-воздействия соответственно. Полнотранскриптомный анализ изменений экспрессии генов проводили через 6ч от момента введения препаратов с помощью RNA-seq.

Анализ изменения содержания мРНК всех белок-кодирующих генов (22030) показал, что стресс изменил экспрессию 932 генов, из которых 722 гена снизили, а 210 – увеличили экспрессию более чем в 1,5 раза (Padj<0,05). Введение семакса привело к изменению экспрессии 1434 генов: 812 генов увеличили, а 622 – снизили экспрессию относительно контроля. Семакс также оказал действие, компенсирующее эффект стресса: увеличилось содержание мРНК 207 генов и снизилось – 35 генов, на экспрессию которых стресс оказал противоположное воздействие.

Биоинформатический анализ результатов при помощи программного обеспечения «DAVID v6.8» установил, что гены, повысившие экспрессию при воздействии семакса на животных со стрессом, относятся к сигнальным путям, связанным со сплайсингом (*Srsf3, Srsf5, Srf7, Sf3b1*), синтезом белка (*Rpl19, Rpl3, Rpl4, Rps2*), деградацией белка (*Psmc6, Psmd12, Psmd14, Psmb4*), а также транспортировкой белка (*Sec61, Sec62, Sec63, Spcs3*) и РНК (*Eif4a1, Eif1ax, Nup155, Xpot*). В тоже время гены, снизившие экспрессию мРНК, относятся к сигнальным путям, связанным со стабилизацией синапсов (*Frfr1, Actb, Nectin1, Sorbs1*), с каскадом МАРК (*Arrb1, Cacnb1, Cacng7, Map2k5*) и химической аддикцией (*Fosb, Creb3l1, Grin1, Atf6b*). Полученные данные позволяют выявить молекулярно-генетические механизмы действия семакса, лежащие в основе его нейропротективных и антистрессорных свойств.

Исследование было выполнено при поддержке гранта РФФИ КОМФИ № 17-00-00104.

Создание и изучение клеточных линий с CRISPR/Cas9-направленным нокаутом индивидуальных генов для повышенной продукции вируса гриппа

Степанов Г.А.[1], Сергеева М.В.[1,2], Можаева Е.В.[1], Ещенко Н.В.[1], Васильева А.Д.[1,2], Медведев С.П.[1,3], Малахова А.А.[1,3], Васильев К.А.[2], Шурыгина А.-П.С.[2], Семенов Д.В.[1], Журавлев Е.С.[1], Балахонова Е.А.[1], Маланин С.Ю.[4], Григорьева Т.В.[4], Рихтер В.А.[1], Комиссаров А.Б.[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*
[3] *ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия*
[4] *Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Вакцинопрофилактика является наиболее рациональной стратегией борьбы с эпидемиями гриппа. В настоящее время существует очевидная потребность в разработке более технологичных платформ производства вакцин. Перспективным направлением является создание клеточных линий человеческого происхождения, обеспечивающих повышенную репликацию вируса гриппа с максимальным сохранением антигенных свойств. Решение проблемы увеличения пермиссивности клеточных культур путем выключения определенных генов-мишеней методами геномной инженерии положит начало рациональному дизайну линий, чувствительных к заданным патогенам, существенно увеличит эффективность выделения вирусов и обеспечит производство культуральных вакцин стандартизованным субстратом.

В работе проводили нокаут генов-мишеней с помощью внесения точечных разрывов системой CRISPR/Cas9. Были получены моноклональные клеточные линии с нокаутом генов AnxA6 и IRF-7 за счет мутаций, обеспечивающих сдвиг рамки считывания. Далее оценивали уровень накопления вирусных компонентов в клетках модифицированных и исходной линий и показали достоверное увеличение эффективности репликации вируса. Методом титрования на клеточной культуре MDCK были получены ключевые результаты, демонстрирующие повышение уровня накопления инфекционно-активного вируса гриппа в линиях ANXA6-/- и IRF7-/- по сравнению с исходной линией 293FT. Полученный результат подтверждали независимыми методами оценки уровня вирусной РНК и вирусного белка NP в зараженных клетках. Для выявления молекулярных путей, обеспечивающих наблюдаемые эффекты, проводили транскриптомный анализ (Illumina RNA-Seq) изменений в уровне экспрессии генов в модифицированных линиях в условиях заражения вирусом гриппа А. Изменения в уровне и структуре мРНК генов-мишеней были подтверждены данными массового параллельного секвенирования.

Таким образом, была продемонстрирована возможность повышения продуктивности наработки вируса гриппа в клеточной линии человеческого происхождения путем направленного нокаута даже единичных генов. Индивидуальный нокаут выбранных генов-мишеней является первым этапом конструирования высокопермиссивной клеточной культуры для наработки широкого набора штаммов вирусов гриппа.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда №18-75-10069.

Невирусные иммуногены для индукции зародышевых предшественников широко-нейтрализующих антител против вируса иммунодефицита человека

Таранин А.В.[1], Горчаков А.А.[1], Баранов К.О.[1], Наякшин А.М.[1], Волкова О.Ю.[1], Чикаев Н.А.[1], Мечетина Л.В.[1], Гусельников С.В.[1], Кулемзин С.В.[1], Тиллиб С.В.[2], Черникова Д.С.[1], Беловежец Т.Н.[1]

[1] *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*

Антитела против консервативных эпитопов вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), получили название широко-нейтрализующих (bnAb) благодаря своей способности блокировать различные генетические варианты ВИЧ-1. Индукция bnAb в ходе профилактической вакцинации позволила бы обеспечить защитный иммунитет против ВИЧ-инфекции. Проблема в том, что в наивном В-клеточном репертуаре человека нет антител, способных связывать консервативные эпитопы ВИЧ с высокой аффинностью. Наиболее эффективные bnAb появляются в результате длительного накопления мутаций в определенных зародышевых предшественниках. Эти немутированные предшественники (uca-bnAb) кодируются редкими комбинациями VH- и VL-генов и, что особенно важно, не взаимодействуют с вирусными белками. Таким образом, для генерации bnAb в ходе профилактической вакцинации необходимы, прежде всего, иммуногены, способные стимулировать uca-bnAb-экспрессирующие В-лимфоциты. Антитела класса VRC01 против CD4-связывающего сайта ВИЧ относятся к числу наиболее действенных и обеспечивают защиту от 90% генетических вариантов ВИЧ. В основе bnAb VRC01 лежит комбинация VH1-2 и VK3-11/3-20 доменов. Наивные В-клетки, экспрессирующие uca-VRC01, встречаются в периферической крови с частотой менее 0,001% и не стимулируются вирусными белками. С целью создания иммуногенов для селективной активации таких клеток мы сконструировали панель антиидиотипических агентов (АИА), специфично распознающих идиотопы uca-VRC01 в виде моноклональных антител мыши, однодоменных антител верблюда и однодоменных антител ламы. Все полученные АИА обладали способностью активировать сенсорные В-клетки, несущие uca-VRC01 в составе В-клеточного рецептора. Цитометрический анализ показал, что популяция В-лимфоцитов, связывающих АИА, в периферической крови здоровых доноров составляет менее 0,01%. Эти В-клетки были выделены и репертуары продуцируемых ими антител были определены с помощью высокопроизводительного секвенирования или индивидуального клонирования генов иммуноглобулинов. Полученные результаты показали значительное обогащение выделенной популяции клеток В-лимфоцитами, экспрессирующими характерные для VRC01-класса гены VH1-02, VK3-20 и VK3-11. Таким образом, АИА могут быть использованы для индукции предшественников bnAb VRC01.

Работа поддержана грантами РФФИ № 16-04-00915 и 18-29-08051.

Субстратная специфичность иммуноглобулинов класса G человека, обладающих оксидоредуктазными активностями

Толмачева А.С., Невинский Г.А.

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

В настоящее время показано, что иммуноглобулины класса G человека и животных обладают супероксиддисмутазной и каталазной активностями.

В данной работе установлено, что иммуноглобулины класса G крови здоровых доноров проявляют два типа активности: пероксидазную (в присутствии H_2O_2) и оксидоредуктазную (в отсутствие H_2O_2). На основании выполнения общепринятых критериев, таких как электрофоретическая гомогенность препаратов IgG, гель-фильтрация в условиях «кислого шока», аффинная хроматография IgG на анти-L-сефарозе, а также анализ активности препаратов антител *in situ*, доказано, что эти активности принадлежат непосредственно антителам.

Известно, что пероксидазы и оксидоредуктазы млекопитающих характеризуются широкой субстратной специфичностью и окисляют различные органические соединения, такие как ароматические амины, фенолы, нафтолы, многие из которых известны как мутагены или канцерогены, а также катехоламины, стероидные гормоны и другие биологически активные молекулы.

Впервые показано, что IgG крови здоровых доноров, эффективно окисляют различные соединения: 3,3'-диаминобензидин (DAB), диаммониевую соль 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфокислоты) (ABTS), *o*-фенилендиамин (OPD), гомованилиновую кислоту (HVA), α-нафтол, гидрохинон, 5-аминосалициловую кислоту (5-ASA) и 3-амино-9-этилкарбазол (AEC). Определены значения кажущихся k_{cat}, характеризующих окисление данных соединений при их фиксированной концентрации. Среднее значение кажущихся k_{cat} (мин$^{-1}$) при H_2O_2-зависимом окислении субстратов иммуноглобулинами G уменьшалось в следующем порядке: ABTS (73,7 ± 12,0) ≥ DAB (66,3 ± 12,0) > AEC (38,0 ± 8,5) > HVA (19,8 ± 5,6) ≥ α-нафтол (8,6 ± 8,5) > OPD (0,62 ± 0,20) ≥ 5-ASA (0,48 ± 0,65) > гидрохинон (0,24 ± 0,42). В отсутствие H2O2 значения кажущихся *k*cat (мин$^{-1}$) уменьшались в порядке: DAB (52.1 ± 5,3) ≥ ABTS (50.5 ± 12,9) > OPD (0,25 ± 0,20). Пять остальных веществ не являлись субстратами оксидоредуктазной активности IgG. Пероксидазная активность иммуноглобулинов G выше оксидоредуктазной при окислении таких соединений, как DAB, ABTS и OPD в 1,3, 1,5 и 2,5 раз соответственно. Эти данные свидетельствуют о возможном участии поликлональных IgG человека в качестве дополнительной природной системы детоксификации активных форм кислорода, а так же различных мутагенных и канцерогенных соединений.

Исследование поддержано грантом РНФ № 19-15-00145.

Активация иммунной системы рекомбинантным вирусом осповакцины, кодирующим лактаптин и ГМ-КСФ человека

Троицкая О.С.[1], Варламов М.Е.[1,2], Нуштаева А.А.[1], Кулигина Е.В.[1], Рихтер В.А.[1], Коваль О.А.[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия*

Онколитические вирусы являются перспективными агентами для лечения онкологических заболеваний. Вставка специфических трансгенов в вирусный геном может усилить их противоопухолевую активность путем активации иммунной системы и индукции апоптоза. Доклинические и клинические испытания показали, что аттенуированный вирус осповакцины является эффективным и достаточно безопасным агентом для противоопухолевой терапии. Генетические модификации вируса осповакцины могут повысить избирательность вируса в отношении опухолевых клеток, в том числе через активацию иммунной системы в отношении клеток, зараженных вирусом.

В лаборатории биотехнологии на основе вируса осповакцины был разработан рекомбинантный вирус VV-GMCSF-Lact, несущий трансгены проапоптического белка лактаптина и ГМ-КСФ человека. Ранее мы показали, что VV-GMCSF-Lact вызывает гибель клеток, которая сопровождается транслокацией калретикулина и HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану и выходом белка HMGB1 и АТФ в межклеточное пространство, что должно стимулировать противоопухолевый иммунный ответ. В данной работе мы оценивали влияние вируса VV-GMCSF-Lact на разные аспекты иммунной системы экспериментальных животных.

Показано, что VV-GMCSF-Lact не проявляет аномальную токсичность у морских свинок и беспородных белых мышей. Подкожные инъекции VV-GMCSF-Lact приводят к увеличению размеров селезенки мышей и увеличению популяции CD3+ клеток в селезенке через 7 дней после инъекции. Было установлено, что рекомбинантный вирус усиливает фагоцитирующую активность перитонеальных макрофагов. Показан прямой фагоцитоз макрофагами гибнущих опухолевых клеток, зараженных вирусом VV-GMCSF-Lact.

Работа была поддержана ПФНИ ГАН № # АААА-А17-117020210023-1 и грантом VolkswagenStiftung #90315.

Оптимизация способов подготовки препаратов бактериофагов для длительного хранения

Ушакова Т.А., Морозова В.В., Козлова Ю.Н., Тикунов А.Ю., Тикунова Н.В.

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

Для использования бактериофагов в терапии немаловажное значение имеет форма используемого препарата и сохранение активности действующего вещества в течение длительного времени. Исследование стабильности сухих препаратов бактериофагов проводилось с использованием бактериофагов из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН. В эксперименте были использованы бактериофаги, специфичные к штаммам *Proteus mirabilis, Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis*, обладающие различными морфотипами (*Podoviridae, Siphoviridae* и *Myoviridae*).

Препараты подвергали высушиванию с использованием вакуумного концентратора (Эппендорф, Германия), используя для стабилизации препаратов различные наполнители: сухое обезжиренное молоко, альбумин бычий сывороточный и поливинилпирролидон. Хранение сухих препаратов проводили параллельно при 4°С в течение года и при 37°С в течение 2 недель. Определяли жизнеспособность бактериофагов методом титрования через 1 месяц, полгода и год хранения препаратов при 4°С и через сутки, неделю и две недели хранения при 37°С.

Показано, что бактериофаги различных морфотипов по-разному переносят высушивание; так, фаги сем-ва *Podoviridae* хорошо переносят сушку как в присутствии наполнителей так и без них, фаги семейства *Myoviridae* хорошо сохраняют жизнеспособность после сушки в молоке или альбумине, а фаги *Siphoviridae* наименее стабильны и сохраняются при высушивании только в присутствии молока в качестве наполнителя. Показано, что хранение высушенных препаратов при 4°С значительно эффективнее, чем при 37°С; при этом было выявлено, что подовирусы стабильно сохраняются в течение 12 мес при 4 °С независимо от наполнителя. Представители семейств *Myoviridae* и *Siphoviridae* стабильно хранятся в течение 12 месяцев только в присутствии сухого молока или альбумина. Таким образом, длительное хранение сухих препаратов бактериофагов различных морфотипов возможно в присутствии наполнителей, аналогичных сухому молоку или бычьему сывороточному альбумину. Высушенные с такими наполнителями препараты хранятся в течение года при 4 °С без видимой потери активности.

Работа выполнена при поддержке Фонда РФФИ, проект № 18-29-08015.

Получение и исследование наноструктурированных материалов в качестве компонентов систем доставки лекарственных средств

Фоменко В.К.[1,2], Бобрикова Е.Н.[1,2], Дмитриенко Е.В.[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Одно из возможных решений проблемы доставки лекарственных препаратов – конструирование «умных контейнеров». Для создания подобных систем часто используют стратегию многослойной сборки, которая предполагает получение твердотельного носителя, с последующей модификацией его поверхности. В качестве носителей широко используют такие материалы, как липосомы, мицеллы, вирусные нанокострукции, квантовые точки, а также наночастицы (НЧ) [1]. Последние применяют в качестве основ систем доставки благодаря их способности эффективно проникать в клетку, а также выступать в качестве «депо» с модифицированной поверхностью, что обеспечивает концентрирование лекарственных препаратов в трансформированных тканях. В клинической практике уже используется ряд одобренных лекарственных форм на основе НЧ.

Таким образом, целью работы является получение и исследование наноструктурированных материалов в качестве компонентов систем доставки лекарственных средств.

Для наноматериалов применяемых в биомедицине существует ряд требований: они должны быть не токсичными, биосовместимыми, субмикронного размера, а так же желательным условием является биоразлагаемость. Для применения *in vivo* оптимальный диаметр наночастиц от 10 нм до 200 нм. Синтезированы и охарактеризованы НЧ оксида железа, карбоната кальция, диоксида кремния, золота, а также композитные наноматериалы на основе нейлона-6, все полученные в ходе работы материалы соответствуют предъявляемым требованиям. Образцы охарактеризованы методами динамического светорассеивания и просвечивающей электронной микроскопией. Определены оптимальные условия стабилизации НЧ в физиологических условиях. Исследована возможность модификации поверхности наноматериалов, в том числе с возможным последующим введением компонентов, способствующих адресной доставке препарата. Проведен ряд экспериментов по определению эффективности сорбции на частицы высокотоксичного противоопухолевого антибиотика – доксорубицина (DOX), широко используемого в медицинской практике для лечения обширного спектра раковых опухолей. Определена ёмкость для всех типов полученных наноматериалов. Показано, что максимальной ёмкостью обладают НЧ катбоната кальция, а также композитные наноматериалы на основе нейлона-6. Исследована эффективность высвобождения препарата *in vitro* в различных условиях, в том числе в биологических жидкостях.

1. Mo R., Gu Z. Tumor microenvironment and intracellular signal-activated nanomaterials for anticancer drug delivery //Materials Today. – 2016. – V. 19. – №. 5. – P 274-283.

Исследование было поддержано 0309-2016-0004 и РНФ 18-14-00357.

Изготовленные методом электроспиннинга гемосовместимые материалы: влияние поверхностной экспозиции RGD-пептида на эндотелизацию

Черепанова А.В.[1,2], Акишева Д.[1], Годовикова Т.С.[1], Попова Т.В.[1], Чернявский А.М.[2], Челобанов Б.П.[1], Лактионов П.П.[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Россия*

Эндотелизация поверхности протезов сосудов необходима для их гемосовместимости, ингибирования гиперплазии неоинтимы и стеноза в долговременной перспективе. Модификация материала пептидами, такими как IKVAV или RGD, которые узнаются белками клеточной поверхности, часто используется для повышения адгезии эндотелиоцитов и их предшественников. Однако, поскольку протромбогенные и провоспалительные клетки также связывают эти пептиды, при их использовании для эндотелизации необходимо тщательно подбирать условия для селективного связывания эндотелиальных клеток. Целью представленной работы являлась разработка и изготовление методом электроспиннинга матриксов, экспонирующих RGD пептид и обладающих повышенным сродством к эндотелиальным клеткам по сравнению с клетками крови.

Для синтеза коньюгата ЧСА-RGD в молекулу ЧСА вводили линкер с остатком малеимида, с последующей функционализацией модифицированного белка пептидом (-Arg-Cly-ASP-D-Phe-Cys) (RGDfC) (AnaSpec, США) через реакцию сопряженного присоединения по Михаэлю. В соответствии с данными электрофореза, ЯМР и УФ-спектроскопии одна молекула ЧСА ковалентно связана с тремя пептидами RGDfC.

ЧСА-RGD матриксы были изготовлены методом электроспиннинга из раствора базового полимера Tecoflex EG-80A (Lubrizol advanced materials, США) в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропаноле с добавлением 10 % ЧСА (от массы полимера) и ЧСА-RGD в диапазоне концентраций от 0,01 - 1,3 %. Структура матриксов была исследована при помощи сканирующей электронной микроскопии. Представленность ЧСА-RGD на поверхности матриксов была подтверждена методом ИК-Фурье спектроскопии.

Конъюгат ЧСА-RGD, введенный в состав поверхностного слоя матрикса методом электроспиннига, повышает эффективность связывания первичных эндотелиальных клеток с матриксом: эффект зависит от концентрации конъюгата, максимум достигается при 1 % содержании ЧСА-RGD. При этом ЧСА-RGD конъюгат в составе матрикса не усиливает связывание форменных элементов крови, что свидетельствует о гемосовместимости полученных матриксов.

Таким образом, в работе предложен новый способ модификации материалов функциональными пептидами путем введения модифицированного белка в раствор для электроспиннига.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 17-75-30009 и Проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210026-2 (Челобанов Б.П.).

Новые 2'-дезоксиуридин-5-алкилкарбоксамид-5'-трифосфаты для ферментативного синтеза ДНК с высокой степенью модификации

Василисков В.А.[1], Лапа С.А.[1], Кузнецова В.Е.[1], Шершов В.Е.[1], Чудинов А.В.[1,2]

[1] *ФГУБН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия*
[2] *ООО «ИБМХ-ЭкоБиоФарм», Москва, Россия*

Химически-модифицированные 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты представляют значительный интерес в качестве субстратов ДНК-полимераз при направленной селекции ДНК-аптамеров. Технология получения ДНК-аптамеров (SELEX) представляет собой последовательность процедур отбора кандидатов из комбинаторных библиотек олигонуклеотидов и последующей амплификации.

Нами осуществлен синтез новых производных 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфата, связанных с 4-нитрофенилуксусной (N1), 4-нитрофенилпропионовой (N2), коричной (N3), 4-нитрокоричной (N4) и 4-имидазолакриловой (N5) кислотами через транс-алкеновый (этиленовый) линкер. Исследована эффективность встраивания модифицированных нуклеотидов в ДНК с высокой степенью модификации в реакции достраивания праймера (primer extension) с Taq ДНК-полимеразой. Реакцию достраивания праймера проводили с использованием матрицы M и праймера P: (M): 5'-(A)20-TTG-TCA-CTC-AGA-CCA-ACT-CCC-T-NH2-3'; (P):5'-Cy3-A-GGG-AGT-TGG-TCT-GAG-TGA-CAA-3'. Исходя из полученных электрофоретических данных, видно, что для всех испытанных нуклеотидов наблюдается смесь ДНК продуктов различной длины. С увеличением времени инкубирования от 5 мин до 4 ч возрастает количество встроившихся нуклеотидов и соответственно максимальная длина достроившегося праймера. Каждый из исследованных трифосфатов N1-N5 позволяет включать в синтезируемую ДНК подряд не менее 7 модифицированных нуклеотидов при использовании Taq ДНК–полимеразы, что является вполне достаточным для получения аптамеров методом SELEX. Использование модифицированных нуклеотидов N1-N5 вместо природного dTTP позволит повысить аффинность получаемых аптамеров.

Исследование было поддержано Федеральной целевой программой «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение №14.576.21.0096, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57617X0096).

Флуоресцентно-меченные красителями ближнего ИК диапазона дезоксиуридинтрифосфаты для двухиндикаторного метода молекулярно-генетического анализа

Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Лапа С.А., Чудинов А.В.

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

Исследование множественных олигонуклеотидных полиморфизмов возбудителя туберкулеза, коррелирующих с резистентностью возбудителя к определенным лекарственным средствам, относится к числу методов, для которых повышение чувствительности, воспроизводимости и надежности анализа крайне актуальны. В подобного рода исследованиях получил развитие метод, основанный на мультиплексной ПЦР с последующим связыванием продуктов амплификации с матрицей иммобилизованных олигонуклеотидных зондов на биологических микрочипах. В этом методе в качестве индикаторной метки для визуализации результатов анализа используются флуоресцентные красители.

Для повышения точности анализа и контроля качества изготовления и хранения тест-систем на основе биочипов предложена двухиндикаторная система анализа и контроля, включающая флуоресцентное маркирование иммобилизованных на полимерной подложке олигонуклеотидных зондов индокарбоцианиновыми красителями, флуоресцирующими в области 550-600 нм (Cy3), и флуоресцентное маркирование продуктов ПЦР индотрикарбоцианиновыми красителями ближнего ИК диапазона с максимумами флуоресценции в диапазоне 750-800 нм (Cy7). Выбранные спектральные диапазоны не пересекаются и позволяют независимо анализировать количество иммобилизованных олигонуклеотидных зондов и гибридизуемых на биочипе продуктов амплификации.

В данной работы синтезировали дезоксиуридинтрифосфаты флуоресцентно-меченные красителями Cy7. Для этого синтезировали 2 водорастворимых дисульфированых карбоксилсодержащих индотрикарбоцианиновых красители с пропил- и пентиламмониевыми заместителями в положении 1 индоленинового фрагмента. Красители в фосфатно-солевом буферном растворе при pH 7.4 имеют максимумы поглощения 744 нм и 749 нм, максимумы флуоресценции 767 нм и 770 нм, коэффициенты молярной экстинкции 200000 и 248000, квантовые выходы флуоресценции 0.27 и 0.29. Красители обладают термо- и фотостабильностью достаточной для использования в условиях ПЦР и гибридизационного анализа. Красители перевели в активные производные в виде соответствующих *n*-нитрофениловых эфиров и сконденсировали в водно-органической среде с 5-аминоаллил-2'-дезоксиуридин-5'-трифосфатом. Полученные флуоресцентно-меченные дезоксиуридинтрифосфаты добавляли в ПЦР к используемым dNTP. Установлено, что маркированные трифосфаты выдерживают условия ПЦР, не ингибируют полимеразу и эффективно встраиваются в продукты амплификации в соответствии с матрицей копирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2018-2020 г.г.»

Получение рекомбинантных антистазин-подобных белков медицинской пиявки в культуре клеток эмбриональной почки человека

Широков Д.А.[1,2], Графская Е.Н.[1,3], Белова А.М.[1], Бобровский П.А.[1], Лавренова В.Н.[1,4], Дмитриева М.А.[1,2], Лацис И.А.[1], Бабенко В.В.[1], Манувера В.А.[1,3], Лазарев В.Н.[1,3]

[1] *ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия*
[2] *ФГБОУ ВО «Московская Государственная Академия Ветеринарной Медицины и Биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия*
[3] *ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия*
[4] *ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия*

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются одним из основных вызовов для современной медицины. Ежегодно в мире от ССЗ умирает около 18 миллионов человек, и этот показатель имеет тенденцию к росту. В связи с этим разработка новых препаратов, влияющих на гемостаз, представляется крайне актуальной задачей. При анализе генома медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* нами была обнаружена целая группа генов, кодирующих белки, гомологичные описанному ранее антикоагулянту антистазину [1]. Структура антистазина характеризуется наличием двух гомологичных доменов, каждый из которых содержит по 10 остатков цистеина, формирующих пять внутридоменных дисульфидных связей. Белки с похожими антистазин-подобными доменами были найдены у многих многоклеточных животных. Целью данной работы являлось получение рекомбинантных антистазин-подобных белков *H. medicinalis* в эукариотической системе экспрессии и проверка их влияния на гемостаз. Всего было выбрано 14 открытых рамок считывания гомологов антистазина. ДНК-фрагменты, кодирующие антистазин-подобные белки, были получены методом ПЦР, используя в качестве матрицы кДНК-библиотеку слюнных желёз медицинской пиявки. Далее данные фрагменты были клонированы в составе плазмидных векторов, содержащих последовательности, кодирующие лёгкую цепь иммуноглобулина кролика с сигнальным пептидом под контролем промотора немедленно-ранних генов цитомегаловируса. Полученными векторами трансфицировали культуру клеток эмбриональной почки человека Expi293F, после чего оценивали накопление целевых рекомбинантных белков в культуральной жидкости. Химерные белки выделяли металл-хелатной хроматографией, после чего отщепляли лёгкую цепь иммуноглобулина кролика TEV-протеиназой и проводили очистку антистазин-подобных белков ионообменной хроматографией. При исследовании антикоагуляционных свойств полученных рекомбинантных белков для двух гомологов антистазина было продемонстрировано увеличение АЧТВ в сравнении с контролем.

1. *Nutt E. et al. The amino acid sequence of antistasin. A potent inhibitor of factor Xa reveals a repeated internal structure. J. Biol. Chem. 263:10162-10167 (1988).*

Исследование поддержано грантом РНФ № 177520099.

Растительные везикулы в новых подходах к терапии онкологических заболеваний

Штам Т.А.[1,2], Гараева Л.А.[1], Бурдаков В.С.[1], Волницкий А.В.[1], Верлов Н.А.[1], Коневега А.Л.[1]

[1] *НИЦ «Курчатовский институт»-ПИЯФ, Гатчина, Россия*
[2] *НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург, Россия*

Внеклеточные везикулы и экзосомы – природные частицы (30-1000 нм), секретируемые клетками и способные нести белковые молекулы и генетическую информацию, участвуя в межклеточной коммуникации. Создание системы доставки терапевтических препаратов в клетки человека на основе внеклеточных везикул сейчас широко рассматривается в научной литературе. Во-первых, микровезикулы являются естественными частицами, что исключает их токсичность и дальнейшую иммуногенность лекарственного средства. Во-вторых, микровезикулы являются природными переносчиками молекул РНК и белков, сохраняя их стабильность, что предполагает возможность переноса экзогенных терапевтических молекул. В-третьих, микровезикулы обладают эффективным естественным механизмом проникновения в клетки-реципиенты.

В представленной работе мы предлагаем везикулы, выделенные из биологических жидкостей человека, а также сходные с экзосомами наночастицы (СЭНЧ) растительного происхождения, в качестве естественных транспортеров генотоксической РНК или терапевтических белков в опухолевые клетки. Ранее нам удалось продемонстрировать возможность транспорта функциональных siRNA с помощью экзосом в различные клеточные линии человека. Подавление при этом существенного для жизнеспособности клеток гена *RAD51*, приводило гибели ряда опухолевых клеточных линий. Кроме того, позднее, в других работах нами была продемонстрирована возможность переноса экзосомами полноценного белка-онкосупрессора p53.

В этой работе проведено исследование по выяснению потенциальной возможности нагрузки растительных «экзосом» экзогенной РНК или белками для создания естественного переносчика противоопухолевых биомолекул в клетки эндотелия желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека. При проведении исследований мы использовали широкий набор методов, включая, проточную цитофлюорометрию, конфокальную микроскопию, лазерную корреляционную спектроскопию (ЛКС), анализ траекторий наночастиц (НТА) и атомно-силовую микроскопию, а также радиохимические методы работы с изотопом йода-125. В работе были апробированы методики выделения СЭНЧ, а выделенные частицы охарактеризованы методами ЛКС, НТА и микроскопии. С использованием флуоресцентных и радиоактивных меток получены данные об эффективности интернализации везикул растительного происхождения клетками эпителия ЖКТ в моделях клеточных культур. В работе проведены апробация «нагрузки» выделенных СЭНЧ экзогенным генетическим материалом или белками, а также оценка возможности интернализации клетками ЖКТ модифицированных растительных везикул. Результаты убедительно демонстрируют эффективность доставки экзогенного материала с помощью растительных везикул в эпителиальные клетки ЖКТ *in vitro*.

Работа частично поддержана РФФИ 18-015-00289.

Оптимизация нуклеотидной последовательности гена тканевого фактора человека для экспрессии в *Escherichia coli* BL21(DE3)

Щербаков Д.Н.[1,2], Шаньшин Д.В.[1,2], Балабова Д.В.[1], Ерин Д.Н.[3], Коваль А.Д.[4], Фомин А.С.[1,2], Волкова Н.В.[1,2], Ельчанинов В.В.[4]

[1] *ГНЦ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия*
[2] *Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия*
[3] *Алтайский краевой клинический перинатальный центр, Барнаул, Россия*
[4] *Федеральный алтайский научный центр агробиотехнологий, Барнаул, Россия*

Тканевой фактор (ТФ) – трансмембранный белок, высокоаффинный рецептор фактора (ф) свертывания крови VII и VIIa. Комплекс ТФ-фVIIa является первичным активатором внешнего пути коагуляционного гемостаза. В структуре ТФ выделяют 3 домена: внеклеточной (219 аминокислотных остатков (а.о.)), трансмембранный (23 а.о.) и цитоплазматический (21 а.о.) [1,2].

Актуальность исследования ТФ связана с тем, что этот белок входит в состав тканевого тромбопластина – препарата, используемого для диагностики нарушений в системе свертывания крови человека. Описано несколько способов получения рекомбинантного ТФ (рТФ) [3,4]. Оптимизация нуклеотидной последовательности гена ТФ ставит своей целью увеличение выхода рТФ в прокариотической системе экспрессии.

Для получения рТФ в системе *Escherichia coli* проводили оптимизацию кодонного состава кодирующей части гена ТФ при помощи сервиса Integrated DNA Technologies [https://eu.idtdna.com/CodonOpt]. Кроме того, из состава последовательности удаляли фрагмент, кодирующий цитоплазматический домен. Полученная нуклеотидная последовательность была встроена в экспрессионный вектор pET21a, которым трансформировали штамм BL21(DE3) *E. coli*. Для определения локализации и эффективности наработки рТФ, клеточную биомассу анализировали методом электрофореза по Laemmli.

Установлено, что оптимизация кодонного состава приводит к увеличению выхода целевого белка в 3-4 раза, по сравнению с контролем, в качестве которого выступал исходный ген ТФ. Преимущественная локализация целевого белка – тельца включения.

1. *Morrissey J.H. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor Thromb. Haemost.- 2001.- V. 86.- P. 66–74.*
2. *Mackman N., Tilley R.E., Key N.S. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis . Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.- 2007.- V. 27.- P. 1687–1693.*
3. *Paborsky L.R., Tate K.M., Harris R.J., Yansura D.G., Band L., др. всего 13 человек. Purification of recombinant human tissue factor. Biochemistry.- 1989.- V. 28.- P. 8072-8077.*
4. *Stone M.J., Ruf W., Miles D.J., Edgington T.S., Wright P.E. Recombinant soluble human tissue factor secreted by Saccharomyces cerevisiae and refolded from Escherichia coli inclusion bodies: glycosylation of mutants, activity and physical characterization. Biochem. J. - 1995.- V. 310.- P. 605-614.*

Исследование было поддержано грантом Управления Алтайского края по пищевой, перерабатывающей, фармацевтической промышленности и биотехнологиям. (Соглашение № 4 от 17.05.2019 г.).

Моделирование структур фермент-субстратных комплексов и кинетический анализ взаимодействия мутантных форм SMUG1 F98W, H239A и R243A с ДНК

Яковлев Д.А.[1,2], Алексеева И.А.[1], Воробьев Ю.Н.[1,2], Канажевская Л.Ю.[1], Кузнецов Н.А.[1,2], Федорова О.С.[1,2]

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН), Новосибирск, Россия
2 Факультет естественных наук, Новосибирский государственный университет (НГУ), Новосибирск, Россия

Урацил-ДНК-гликозилаза человека SMUG1 участвует в пути эксцизионной репарации оснований в ДНК. Этот фермент распознает и гидролизует N-гликозидную связь остатков уридина и его С5-производных: 5-гидроксиметилурацила, 5-формилурацила и 5-гидроксиурацила.

Сравнение ДНК-гликозилаз, принадлежащих к различным структурным семействам, показало, что механизм образования каталитически компетентного комплекса включает в себя начальное связывание ДНК и образование неспецифического комплекса, изгибание цепи ДНК, выворачивание поврежденного основания из двойной спирали и его размещение в активном центре фермента.

Ранее нами был проведен кинетический анализ конформационных переходов фермента hSMUG1 дикого типа и ДНК в ходе каталитического процесса [1]. В данной работе изучали конформационную динамику мутантных форм hSMUG1 F98W, H239A и R243A при их взаимодействии с ДНК.

Конформационные переходы в ферменте и ДНК моделировали с помощью метода молекулярной динамики, а также наблюдали в реальном времени с использованием метода "остановленной струи" с регистрацией флуоресценции остатков триптофана в белке или 2-аминопурина и FAM/BHQ1 пары в ДНК.

Сопоставление кинетических данных и модельных структур фермент-субстратных комплексов позволили улучшить молекулярно-кинетический механизм взаимодействия SMUG1 с ДНК и определить роль аминокислотных остатков Phe98, His239 и Arg243 в узнавании повреждения и последующем катализе.

Полученные результаты показали, что замена Phe98 и His239 на Trp и Ala, соответственно, приводит к почти полной инактивации фермента, что свидетельствует о ключевой роли этих остатков в распознавании субстрата и образовании каталитически активного комплекса фермент-субстрат. Обнаружено, что замена Arg243 на Ala облегчает диссоциацию комплекса SMUG1 с продуктом реакции, что указывает на участие Arg243 в связывании ДНК.

1. *Kuznetsova A., Iakovlev D., Misovets I., Ishchenko A., Saparbaev M., Kuznetsov N., Fedorova O. Pre-steady-state kinetic analysis of damage recognition by human single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase SMUG1 // Mol. Biosyst. - 2017. - V. 13(12). - P 2638-2649.*

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 16-14-10038.

3-Метил-5-(перилен-3-илэтинил)урацил-1-уксусная кислота и ее амиды

Слесарчук Н.А., Никитин Т.Д., Сапожникова К.А., Брылёв В.А., Устинов А.В., Чистов А.А.

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

Принимая во внимание высокую активность 5-(перилен-3-илэтинил)-производных урацильных нуклеозидов по отношению к широкому спектру оболочечных вирусов [1–6] и их «ненуклеозидный» механизм действия (мишенью является липидная мембрана вириона) мы получили производные 5-(перилен-3-илэтинил)урацил-1-уксусной кислоты и показали их высокую антивирусную активность [7]. Таким образом, было доказано, что углеводный фрагмент в периленовых антивирусных нуклеозидах не имеет функциональной роли. Для исследования влияния на активность и растворимость модификации положения N3 урацила в подобных соединениях мы разработали метод получения 3-метил-5-(перилен-3-илэтинил)урацил-1-уксусной кислоты и ее амидов. Синтезированные вещества обладают высокой активностью в отношении оболочечных вирусов в культуре клеток. Методом спектрофотометрии изучена растворимость соединений в системе DMSO/H_2O.

1. St.Vincent M.R. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010, 107 (40), 17339–17344.
2. Colpitts C.C. et al. J. Virol., 2013, 87 (7), 3640–3654.
3. Orlov A.A. et al. MedChemComm, 2016, 7 (3), 495–499.
4. Hakobyan A. et al. J. Gen. Virol., 2018, 99 (1), 148–156.
5. Speerstra S. et al. Antivir. Res., 2018, 149, 164–173.
6. Proskurin G.V. et al. Eur. J. Med. Chem., 2018, 155, 77–83.
7. Chistov A.A. et al. Eur. J. Med. Chem., 2019, 171, 93–103.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ 15-15-00053.

Новые клеточные технологии в исследовании туберкулеза легких человека: разработка и использование в фундаментальной и персонифицированной медицине

Уфимцева Е. Г.[1,2], Еремеева Н. И.[2], Вахрушева Д. В.[2], Скорняков С. Н.[2]

[1] НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия
[2] УНИИ фтизиопульмонологии НМИЦ ФПИ Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Туберкулез (ТБ), вызванный Mycobacterium tuberculosis (Mtb), остается одной из значимых проблем мирового здравоохранения и требует развития новых технологий для анализа особенностей взаимоотношений возбудителя заболевания с клетками-хозяевами у пациентов, больных ТБ легких. В легкие человека Mtb попадают воздушно-капельным путем и инфицируют альвеолярные макрофаги. Способность избегать иммунного ответа хозяина и действия противотуберкулезных препаратов (ПТП) превращает Mtb в очень эффективного и распространенного в человеческом обществе патогена. Заболевание человека трудноизлечимым ТБ часто требует оперативного вмешательства с удалением тканей легких. Мы разработали способ получения культур альвеолярных макрофагов из тканей легких, удаленных в ходе оперативного лечения пациентов, больных ТБ [1]. Способ позволяет за несколько дней определить зараженность Mtb клеток легких [1], функциональный статус [2] и вирулентность патогена 3], характерные для пациента на момент операции. Также разработан способ определения способности Mtb к активации размножения в макрофагах легких с оценкой рисков реактивации ТБ процесса у пациентов, прошедших курс с ПТП, в послеоперационный период лечения [4]. Предложен способ оценки антимикобактериального действия различных доз как известных, так и новых ПТП у пациентов, больных ТБ легких с множественной и широкой лекарственной устойчивостью [5]. Экспериментальные подходы позволили однозначно выявить только внутрифагосомальную нишу выживания Mtb в альвеолярных макрофагах пациентов с ТБ и показать тесную связь этих компартментов с внутриклеточными транспортными путями, но не с лизосомами клеток-хозяев [6].

1. Уфимцева Е.Г., Еремеева Н.И., Кравченко М.А., Скорняков С.Н. Способ получения ex vivo культур альвеолярных макрофагов из операционного материала больных туберкулезом легких и способ оценки вирулентности Mycobacterium tuberculosis с использованием полученных ex vivo культур альвеолярных макрофагов. Патент РФ на изобретение № 2593725 (зарегистрирован 14 июля 2016 г.). Бюл. № 22.
2. Ufimtseva E, Eremeeva N, Petrunina E, Umpeleva T, Karskanova S, Baiborodin S, Vakhrusheva D, Kravchenko M, Skornyakov S. Ex vivo expansion of alveolar macrophages with Mycobacterium tuberculosis from the resected lungs of patients with pulmonary tuberculosis. PLoS ONE 2018; 13(2): e0191918. doi: 10.1371/journal.pone.019191
3. Ufimtseva EG, Eremeeva NI, Petrunina EM, Umpeleva TV, Baiborodin SI, Vakhrusheva DV, Skornyakov SN. Mycobacterium tuberculosis cording in alveolar macrophages of patients with pulmonary tuberculosis is likely associated with increased mycobacterial virulence. Tuberculosis, 2018, 112:1-10. doi: 10.1016/j.tube.2018.07.001
4. Уфимцева Е.Г., Еремеева Н.И., Кравченко М.А., Скорняков С.Н. Способ определения способности микобактерий туберкулеза к размножению в альвеолярных макрофагах пациентов, прошедших курс противотуберкулезной терапии. Патент РФ на изобретение № 2652882 (зарегистрирован 3 мая 2018 г.). Бюл. № 13.
5. Уфимцева Е.Г., Еремеева Н.И., Вахрушева Д.В., Скорняков С.Н. Способ оценки антимикобактериального действия противотуберкулезных препаратов с использованием биологического материала пациентов, больных туберкулезом легких. Патент РФ на изобретение № 2677972 (зарегистрирован 22 января 2019 г.). Бюл. № 3.
6. Ufimtseva E, Eremeeva N, Baiborodin S, Umpeleva T, Vakhrusheva D, Skornyakov S. Mycobacterium tuberculosis with different virulence reside within intact phagosomes and inhibit phagolysosomal biogenesis in alveolar macrophages of patients with pulmonary tuberculosis. Tuberculosis, 2019, 114:77-90. doi: 10.1016/j.tube.2018.12.002

Структурные особенности преодоления объёмных повреждений ДНК-полимеразой лямбда человека в процессе эксцизионной репарации оснований

Речкунова Н. И., Ломзов А. А., Коваль В. В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8
Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Ключевым фактором в понимании механизмов и функции пространственных структур белковых молекул является представление об их формировании и организации. Изучение пространственных структур биологических комплексов требуется не только при разработке лекарственных средств, но и помогает понимать фундаментальные основы клеточных процессов.

Значительную сложность для клетки представляет репарация комбинированных (кластерных) повреждений, состоящих из повреждений разного типа, исправляемых комплексом систем репарации. Понимание фундаментальных механизмов исправления повреждений ДНК необходимо для оценки устойчивости геномной ДНК к повреждающим факторам и возможности предотвращения последствий генотоксических воздействий.

Полученные результаты позволят установить детальный механизм и состав комплекса репарации сложных повреждений ДНК, включающих производные бенз[a]пирена – одного из распространенных канцерогенов окружающей среды.

Целью настоящий работы является изучение механизма репарации объемных повреждений ДНК, образующихся при действии производных бенз[a]пирена (BPDE-N2-dG), и исправляемых системой ЭРН - ДНК-полимеразами.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что на нарушение геометрии всей структуры Pol λ самое существенное влияние оказывает наличие массивного остатка dG-BP в транс-конфигурации. Важно отметить, что транс-конфигурация dG-BP в существенно большей степени нарушает геометрию ДНК-белкового комплекса Pol λ, т.к. массивный остаток BP внедряется в структуру комплекса Pol λ с ДНК в области белковой α-спирали 510-521.

Работа поддержана РФФИ (18-04-00596) и Министерством науки и высшего образования РФ по программе повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров (Проект 5-100). Работа выполнена с использованием вычислительных мощностей Сибирского суперкомпьютерного центра СО РАН www2.sscc.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

A

Aleshkin A. 110
Alexandrov K. 196
Amirloo B. 22
Andrzej Górski 97

B

Bagraynskaya E.G. 139
Bahareh Amirloo 27
Barmatov A.E. 136
Baykov I.K. 119, 146
Bichenkova E.V. 22
Bichenkova Elena 27
Bokovaya O.V.1
Byeang Hyean Kim 23

C

Chojnowski G. 119
Chubarov A.S. 139
Clarke D.J. 22
Patutina O.A. 22
Clokie M.R.J. 188
Cui Z. 196

D

Dąbrowska Krystyna 96

E

Emelynova L.A. 119
Endutkin A.V. 136

F

Fedin M.V. 139
Fofanov M.V. 146
Fox G.E. 138

G

Garcia-Diaz M. 140

H

Haverich A. 110
Haverich A. 99

K

Karpova G.G. 138
Kel A.E. 25
Kim B.H. 137
Koifman O.I. 139
Krumkacheva O.A. 139
Kuehn C. 110

L

Lamzin V. 119
Lebedeva N.Sh. 139
Lee H.J. 24
Letkiewicz Sławomir 97
Liu Y. 138
Logashenko E.B. 25

M

Makasheva K.A. 136
Markov A.V. 25
Matveev A.L. 119
Międzybrodzki Ryszard 97
Mironova N.L. 26
Miroshnichenko S.K. 22
Mohamed I.S. 26
Moor N.A. 119
Morozova Vera 98
Morozova V.V. 146

N

Nadyrova A. 26
Naumenko M.B. 140
Novopashina D.S. 137

P

Popov A.V. 136

R

Raspopova D.Yu. 136
Rogóż Paweł 97
Rubalskii E. 110
Ruemke S. 110

S

Salmoukas C. 110
Semikolenova O.A. 137
Sen'kova A.V. 26
Spitsina A.S. 139
Staroseletz Y.Y. 22
Staroseletz Yaroslav 27
Stepanov V.G. 138

T

Tikunova Nina 98
Tikunova N.V. 119, 146
Timofeev I.O. 139

U

Ushakova T.A. 146

V

Vlassov Valentin 98
Venyaminova A.G. 137

W

Weber-Dąbrowska Beata 97
Willson R.C. 138
Wojciech Fortuna 97
Wu Y. 196

Y

Yatsenko D.D. 136
Yousaf S. 22
Yudkina A.V. 140

Z

Zelentsova E.A. 146
Zenkova M.A. 22, 25,26
Zenkova Marina 27
Zharkov D.O. 136,140

А

Абакумов М.А. 79
Абакумова Т.А. 37
Абрамова Т.В. 160, 172
Аброськина М.В. 65
Аверина О.В. 103, 109, 168, 173, 174
Акишева Д. 221
Алексеева И.А. 227
Алексеева Л.А. 28
Алексеева М.Г. 173
Алексеева М.С. 101
Алемасова Е.Э. 197
Алехина О.М. 192
Алехнович А.В. 99
Алешкин А.В. 99, 110
Алтаев В.Д. 72
Амирханов Н.В. 33
Анарбаев Р.О. 130
Аралов А.В. 30, 196
Артамонова И.И. 168
Артемьева Л.В. 47
Асеев А.Л. 156
Аулова К.С. 141
Ачасова К.М. 151, 175

Б

Бабенко В.В. 161, 224
Бабкин И.В. 143, 144, 150
Багаманшина А.В. 145
Багрянская Е.Г. 118, 198, 199
Байков И.К. 119, 146
Байкова Ю.П. 153
Баклаушев В.П. 62, 93
Балабан П.М. 180
Балабова Д.В. 226
Балахонова Е.А. 57, 215
Баранов К.О. 216
Баранова С.В. 147, 194
Барбараш О.Л. 73
Бардашева А.В. 33, 112, 143, 162, 177
Баринов Н.А. 152
Баулина Н.М. 29
Башмакова Е.Е. 65, 181
Беклемишев А.Б. 206, 209
Белалов И.Ш. 104
Белова А.М. 224
Беловежец Т.Н. 69, 148, 216
Белоусов В.В. 180
Беспятых Ю.А. 179
Билан Д. С. 180
Биченкова Е.В. 60
Бобрикова Е.Н. 220
Бобровский П.А. 149, 161, 224
Богачев С.С. 211
Богуш В.Г. 62
Бойко А.Н. 29
Боковая О.В. 146, 150
Бондаренко Н.А. 80
Бондарь А.А. 178, 203
Борисова М.А. 151, 175
Бородинова А.А. 180
Бочкарева С.С. 99
Бош А. 212
Брикунова О.Я. 79
Бровкина О.И. 93
Брызгунова О.Е. 85
Брылёв В.А. 152, 228
Букато О.Н. 153
Бунева В.Н. 154, 164
Буракова Е.А. 49
Буракова Л.П. 66
Бурдаков В.С. 64, 225
Буркова Е.Е. 63
Буряк Г.А. 156
Бутенко И.О. 192
Бушкова К.К. 101

Бязрова М.Г. 88

В

Вагапова Э.Р. 51, 56
Ванеев А.Н. 79
Варижук А.М. 30, 39, 50
Варламов М.Е. 218
Васецкий Е.С. 186
Василисков В.А. 222
Васильев К.А. 215
Васильева А.Д. 215
Васильева Е.В. 115
Васильева И.А. 130
Васильева Н.Р 175
Васильева Н.С. 31, 158
Васиховская В.А. 155
Вахитова М.А. 50
Веньяминова А.Г. 32, 38, 41, 46, 65, 162
Верлов Н.А. 64, 225
Винокуров А.Г. 93
Власов В.В. 35, 38, 47, 49, 57, 60, 112, 203
Воевода М.И. 204
Войтова А.А. 31, 70, 158
Волков Д.В. 161
Волкова Н.В. 226
Волкова О.Ю. 69, 216
Волницкий А.В. 225
Вологжанникова А.А. 185
Волошина И.О. 112
Волчо К.П. 120
Воробьев П.Е. 65
Воробьев Ю.Н. 125, 227
Воробьева М.А. 65
Воронина Е.Н. 72
Воротеляк Е.А. 200, 210
Вохтанцев И.П. 36, 46
Вторушин С.В. 79
Высоцкий Е.С. 66, 190

Г

Гаврилова М.В. 101
Галев Э.Е. 188
Ганичев Д.А. 106
Гараева Л.А. 225
Гарафутдинов Р.Р. 67
Генералов В.М. 156
Гервас П.А. 81
Гершони Дж.М. 178
Гильванов А.Р. 67
Гладких Д.В. 32, 38, 49
Глазова Н.Ю. 214
Говорун В.М. 192
Годовикова Т.С. 221
Голомидова А.К. 104, 157, 182
Голота О.В. 158
Голубицкая Е.А. 159
Голышев В.М. 160
Гончар Д.А. 155
Гончарова Е.П. 68
Гончарова И.А. 73
Горчаков А.А. 69, 93, 216
Графская Е.Н. 161, 224
Григорьева А.Е. 33, 48
Григорьева Т.В. 57, 215
Гулаев Е.В. 62
Гусельников С.В. 216

Д

Давыдова А.С. 65
Даниленко В.Н. 100, 101, 102, 103, 105, 109, 115, 168, 173, 174
Данилин Н.А. 162
Дашинимаев Э.Б. 93, 208
Демин А.М. 79
Денисов Е.В. 81
Дергунова Л.В. 214
Дзюба С.А. 125
Дмитриева М.А. 224
Дмитриева М.Д. 70, 158
Дмитриенко Е.В. 76, 163, 204, 220
Добродеев А.Ю. 203
Довыденко И.С. 48, 71, 165
Долгова Е.В. 211
Домогатский С.П. 200
Донирова О.С. 72
Донцова О.А. 132
Дубовский И.М. 175
Дульцев Ф.Н. 163
Дуров О.В. 62
Дурыманов А.Г. 156
Дымова М.А. 70, 158
Дырхеева Н.С. 121
Дьяков И.Н. 101

Е

Евсютина Д.В. 153
Ельчанинов В.В. 226
Емельянова Л.А. 119

Епанчинцева А.В. 34, 71
Еремеева Е.В. 66
Ерин Д.Н. 226
Ермаков Е.А. 164
Ермоленко Е.И. 111
Ершова О.Н. 99
Ефимов Б.А. 109
Ефимов С.В. 132
Ещенко Н.В. 195, 215

Ж

Жарков Д.О. 36, 46, 122
Жарков Т.Д. 165
Желтиков А.М. 180
Живетьева С.И. 169
Жоров М.И. 35
Журавина М.А. 166
Журавлев Е.С. 36, 57, 195, 205, 215

З

Завьялов Е.Л. 79
Заиграев В.Ю. 83
Зайцева Э.Г. 204
Закревский Д.Э. 159
Запорожченко И.А. 85
Зарытова В.Ф. 167, 187, 207
Захаревич Н.В. 102, 168
Захаренко А.Л. 120, 172
Захарова О.Д. 120, 169
Зацепин Т.С. 37, 132, 152
Зверева М. Э. 132
Зеленская Е.М. 72
Зеленцова Е.А. 146
Зенкова М.А. 191
Зенкова М.А. 28, 32, 35, 38, 43, 47, 49, 52, 53, 58, 60, 68
Зинченко Н.Д. 54, 170
Золотов А.М. 171
Зубавичус Я.В. 123
Зыбкина А.В. 202

И

Иванисенко В.А. 124, 172
Иванисенко Н.В. 124, 172
Иванов П.А. 104, 188
Иванощук Д.Е. 204
Ильминская А.А. 65
Исаакова Е.А. 30
Исмагилов З.Р. 187

К

Кабилов М.Р. 65, 144
Кабилова Т.О. 35, 53
Кабирова Э.М. 164
Казаков А.С. 185
Казаков О.В. 80
Калабушева Е.П. 200, 208, 210
Калашникова С.Г. 41
Кальсин В.А. 62, 93
Канажевская Л.Ю. 227
Каппенбергер Ж. 131
Карасева А.Б. 111
Карелина У.А. 38
Касакин М.Ф. 83, 205
Кашталап В.В. 73
Кельмансон И.В. 180
Кечин А.А. 91
Ким Д.В. 46
Ким И.И. 80
Ким С.В. 62
Кириллова Ю.Г. 39
Киселев А.М. 81
Киселев И.Н. 74
Киселев И.С. 29
Киселева Е.В. 186
Кискер К. 131
Клименко А.И. 113
Климина К.М. 179
Клинов Д.В. 152
Ковалев Г.И. 115
Коваль А.Д. 226
Коваль В.В. 83, 89, 230
Коваль О.А. 31, 54, 70, 82, 145, 159, 218
Ковтун А.С. 109, 103, 168, 173, 174
Кожевникова Е.Н. 151, 175
Кожевникова О.С. 176
Козлова Ю.Н. 106, 107, 114, 143, 150, 177, 219
Кокин Е.А. 152
Колосова Е.А. 178
Колосова Н.Г. 176
Колпаков Ф.А. 74
Колпакова А.Ф. 74
Комиссаров А.Б. 195, 215
Кондратенко Ю. Д. 111
Коневега А.Л. 64, 225
Коноплянников М.А. 93
Коношенко М.Ю. 85

Корниенко М.В. 189
Коровина Н.Ю. 109
Коршун В.А. 152
Кострюкова Е.С. 179
Костюк А.И. 180
Котова Д.А. 180
Котылева М.П. 111
Кочетов А.В. 113
Кочнева Г.В. 31, 75, 82
Краморенко Н.В. 92
Красицкая В.В. 65, 181
Краснов В.П. 79
Кретьен С.О. 107
Кудрявцев А.Н. 181
Кузнецов Н.А. 125, 227
Кузнецова А.А. 125
Кузнецова В.Е. 184, 222, 223
Кулакова О.Г. 29
Кулемзин С.В. 69, 93, 216
Кулигина Е.В. 31, 54, 70, 82, 86, 158, 170, 218
Куликов Е.Е. 104, 157, 182
Кулишова Л.М. 36
Купер Й. 131
Купрюшкин М.С. 48, 58, 67, 165, 204
Кутумова Е.О. 74

Л

Лавренова В.Н. 224
Лаврик И.Н. 124, 145
Лаврик О.И. 120, 121, 126, 129, 130, 131, 172, 197,212
Ладыгина В.Г. 153
Лазарев В.Н. 149, 161, 183, 224
Лактионов П.П. 85, 203, 221
Ламзин В. 119
Ланин А.А. 180
Лапа С.А. 184, 222, 223
Лапидус А.Л. 111
Лаптева Ю.С. 185
Ларионова М.Д. 190
Латыева О.О. 186
Лацис И.А. 161, 224
Лашин С.А. 113
Лебедев Т.Д. 51,56
Лебедин Ю.С. 88
Лебоф Д. 37
Левина А.С. 167, 187, 207
Левицкая Н.Г. 214
Леплина О.Ю. 206
Летаров А.В. 104, 157, 182, 188, 189
Летарова М.А. 104, 188, 189
Лехнов Е.А. 85
Лимборская С.А. 127, 214
Литвинова Е.А. 151, 175
Лифшиц Г.И. 72, 74
Логашенко Е. Б. 40
Локтев В.Б. 156
Ломзов А.А. 129, 160, 163, 204, 230
Лузина О.А. 120
Лукьянчикова Н.В. 129, 131
Лунева А.С. 52
Лыков А.П. 80

М

Мавлетова Д.А. 101
Мажуга А.Г. 79
Мазуркова Н.А. 167, 207
Максимова О.А. 112
Маланин С.Ю. 57, 215
Малахова А.А. 215
Маликова Н.П.66
Малявко А.Н. 132
Манувера В.А. 149, 161, 224
Манцызов А.Б. 132
Маркель А.Л. 187
Марков О.В. 47, 58, 68, 191
Маркова С.В. 66,190
Марсова М.В. 105
Мартынов Г.Н. 180
Марьясина С.С. 132
Маслов М.А. 32, 45, 49, 52
Матвеев А.Л. 119, 162
Матвеева А.Г. 125
Матвеева А.М. 57
Матвеева В.А. 47
Матвиенко Д.А. 69
Матюшкина Д.С. 153, 192
Медведев С.П. 215
Мелешина А.В. 208
Мечетина Л.В. 216
Мещанинова М.И. 32, 38, 41
Милов А.Д. 125
Миннегалиева А.Р. 88
Миронова Н.Л. 28, 42, 60, 191
Мирошниченко С.К. 43, 49
Митрохин С.Д. 99

Мифтахов Р.А., 193
Михайлов С.Н. 44
Михеев А.А. 45
Михеева Е.В. 194
Можаева Е.В. 195, 205, 215
Моор Н.А. 119, 130
Морозов А.Ю. 188
Морозов В.В. 86, 106, 112
Морозов И.В. 178
Морозова В.В. 106, 107, 112, 114, 143, 146, 150, 157, 219
Муреев С.В. 196
Мясоедов Н.Ф. 127, 214

Н

Назаров Г.В. 45
Наташин П.В. 66
Науменко В.А. 79
Науменко К.Н. 197
Наумова О.В. 76, 156, 163
Наякшин А.М. 216
Невинский Г.А. 63, 65, 87, 141, 147, 154, 164, 169, 194, 213, 217
Немудрая А.А. 54, 166 170
Нетёсов С.В. 77, 78, 84, 155, 211
Неуместова А.И. 47
Низамов Т.Р. 79
Никитин М.С. 168
Никитин Т.Д. 228
Николаев К.Ю. 72, 204
Нимаев В.В. 80
Новопашина, Д.С. 41, 46, 162
Нуштаева А.А. 54, 70, 86, 159, 166, 170,218

О

Овчеренко С.С. 198, 199
Огнивцев А.А. 200
Орлов М.А. 201
Осидак Е.О. 200
Осипов И.Д. 84, 211
Осьмак Г.Ж. 29
Ощепкова А.Л. 47, 191

П

Павлов В.В. 106, 107
Павлова А.С. 48
Панкова О.В. 81
Панов В.В. 144
Панова А.С. 180
Паршукова Д.А. 154
Пастре Д. 212
Патутина О.А. 43, 49, 60
Пашковская О.А. 85
Переверзев И.М. 91
Перельмутер В.М. 81
Пермяков С.Е. 185
Першина А.Г. 79
Петрова О.А. 132
Петрусева И.О. 129, 131
Печерина Т.Б. 73
Пиндюрин А.В. 151
Побегуц О.В. 153
Повещенко О.В. 80
Позмогова Г.Е. 30, 39, 50
Покровский А.Г. 83
Полежаева О.А. 202
Полетаев А.Б. 108
Полетаева Ю.Е. 71
Полуэктова Е.У. 105, 115
Польшаков В.И. 132
Полякова С.И. 103, 109, 174
Пономарева А.А. 81, 85,203
Попова Е.В. 29
Попова Т.В. 221
Порываева А.В. 204
Почечуев М.С. 180
Прасолов В.С. 51, 56
Предтеченская Е.В. 83
Протопопова Е.В. 156
Прохоров И.А. 39
Прохорова Д.В. 57, 205
Пузырев В.П. 73
Пурвиньш Л.В. 87
Пучков П.А. 52
Пыхтина М.Б. 206, 209
Пышная И.А. 34, 48, 71, 76, 204
Пышный Д.В. 48, 58, 67, 76, 91, 160, 163, 165
Пьянков О.В. 202
Пьянков С.А. 156, 202
Пятков К.И.37

Р

Разумов И.А. 79
Райниссон Дж. 169
Ракитина Д.В. 153
Ракшун Я.В. 133

Ребриков Д.В. 103, 173, 174
Рейниссон Й. 120
Репкова М.Н. 167, 187, 207
Реунов Д.Г. 208
Риттер Г.С. 211
Рихтер В.А. 31, 54, 57, 82, 86, 145, 158, 159, 215, 218
Рогачев А.Д. 83
Родимова С.А. 208
Родина Е.В. 132
Романенко М.В. 84, 155, 211
Романов В.П. 206, 209
Рубальский Е.О. 99, 110
Рыкова Е.Ю. 85, 203
Рябинин А.А. 210
Рябчикова Е.И. 33, 34, 71

С

Савельева А.В. 54, 86, 166, 170
Савин И.А. 49, 53
Савиновская Ю.И. 54, 86, 170
Салахутдинов Н.Ф. 120
Саломатина О.В.1,
Суслов Е.В. 120
Самохин А.Г. 107
Санжаров А.Е. 93
Сапожникова К.А. 228
Сафатов А.С. 156
Сахабутдинова А.Р. 67
Себенцова Е.А. 214
Северов В.В. 30, 50
Седых С.Е. 87
Селезнева М.А. 109
Семенов Д.В. 36, 54, 57, 86, 166, 170, 204, 215
Сенькова А.В. 28, 49, 53, 55, 191
Сергеева М.В. 195, 215
Сиволобова Г.Ф. 75
Сизова М.А. 84, 211
Сильников В.Н. 172
Сингатулина А.Ш. 212
Слесарчук Н.А. 228
Смагина А.С. 93
Смирнов И.В. 134
Смирнова Л.П. 154
Снегирева Н.А. 101
Снытникова О.А. 151, 175
Соболева С.Е. 213
Соколов А.С. 185
Соловьева О.И. 111
Солодкий В.В. 202
Сорока Н.В. 64
Спирин П.В. 51, 56
Ставчанский В.В. 214
Степанов Г.А. 36, 54, 57, 166, 170, 195, 205, 215
Стеценко Д.А. 49
Струнов А.А. 58
Субракова В.Г. 69
Суворов А.Н. 111
Суровцева М.А. 80
Суханова М.В. 212

Т

Танкевич М.В. 39
Таранин А.В. 69, 93, 216
Телегина Д.В. 176
Тикунов А.Ю. 112, 143, 144, 219
Тикунова Н.В. 106, 107, 112, 114, 119, 143, 144, 146, 150, 162, 177, 219
Тиллиб С.В. 216
Ткачев С.Е. 144
Толмачева А.С. 217
Трифонова Е.А. 113
Троицкая О.С. 145, 159, 218
Тронин А.В. 163
Трошкова Н.Д. 169
Тузиков С.А. 203
Тупикин А.Е. 91
Тупицына А.В. 33
Тураев А.В. 30
Тычина Е. П. 189

У

Урусов А.Е. 141
Устинов А.В. 152, 228
Устьянцева Е.И. 36
Ушакова Т.А. 146, 219

Ф

Фаворова О.О. 29
Фазлетдинова З.Н. 67
Фёдоров Е.А. 107
Федорова О.С. 125, 227
Федотов А.Б. 180
Федотов И. В. 180
Филатов А.В. 88
Филатов А.В. 58
Филиппенков И.Б. 214
Филиппова Е.И. 167, 207

Филиппова Ю.А. 57,166, 170, 205
Фисунов Г. Ю. 153
Фоменко В.К. 220
Фомин А.С. 226
Фомин Б.И. 76, 156
Фофанов М.В. 114, 143, 146
Франк Л.А. 65, 181

Х

Хабардина Е.А. 46
Хамон Л. 212
Хойновски Г. 119
Хоменко Т.М. 120
Хухарева Д.Д. 214

Ц

Цапиева А.Н. 111
Цветков В.Б. 30, 50, 152
Центалович Ю.П. 151

Ч

Чаукина В.В. 65
Чекалина М.С. 101
Челобанов Б.П. 221
Чердынцева Н.В. 81, 85, 203
Черепанова А.В. 221
Черников И.В. 32, 38
Черникова Д.С. 216
Черноловская Е.Л. 32, 35, 38, 41, 53, 59
Черноносов А.А. 89
Черных Е.Р. 206
Чернышова И.Н. 101
Чернявский А.М. 221
Чечушков А.В. 114
Чиглинцева Д.А. 60
Чикаев А.Н. 69
Чикаев Н.А. 69,216
Чинак О.А. 198, 199
Чистов А.А. 228
Чудинов А.В. 171, 184, 193, 222, 223
Чумаков П.М. 90

Ш

Шаньшин Д.В. 226
Шаповал А.И. 178
Швалов А.Н. 112
Швейгерт И.В. 159
Шевелев Г.Ю. 91
Шевелев О.Б. 79
Шепелев Н.М. 132
Шернюков А.В. 198, 199
Шерстюк Ю.В. 172
Шершов В.Е. 184, 222, 223
Шикина Н.В. 167, 207
Широков Д.А. 224
Шитиков Е.А. 179
Шлихт А.Г. 92
Шмендель Е.В. 32, 45, 49, 52
Шрайнер Е.В. 112
Штам Т.А. 64, 225
Штейнгарц В.Д. 169
Шульгин А.А. 51
Шурыгина А.-П.С. 215

Щ

Щеголева А.А. 81
Щербаков Д.Н. 156, 178, 202, 226

Э

Энтелис Н.С. 41
Эуртивонг Ч. 169

Ю

Юнес Р.А. 115
Юнусова А.Ю. 145
Юсубалиева Г.М. 93

Я

Яковец Е.А. 106
Яковлев Д.А. 227
Ямпольский И. В. 94
Янкайте Е.В. 80

СПИСОК УЧАСТНИКОВ

Bichenkova Elena Vladimirovna	The University of Manchester, Manchester, Великобритания *elena.v.bichenkova@manchester.ac.uk*
Dąbrowska Krystyna	Bacteriophage Laboratory of Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Вроцлав
Kim Byeang Hyean	Pohang University of Science and Technology (POSTECH), Pohang, Корея (Южная) *bhkim@postech.ac.kr*
Lee Hye Jin	Kyungpook National University, Daegu, Корея (Южная) *leehyejin82@gmail.com*
Liu Yamei	Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals, Nanjing, Китай *lym613@hotmail.com*
Miedzybrodzki Ryszard	Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wroclaw, Польша
Mureev Sergey	Queensland university of technology Brisbane, Австралия *surgey.mureev@qut.edu.au*
Абу-Сбиех Аммар Сами	ООО «Эппендорф Раша»
Алексеева Людмила Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *mila_alex@ngs.ru*
Алешкин Андрей Владимирович	Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва *tikunova@niboch.nsc.ru*
Бабкин Игорь Викторович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *i_babkin@mail.ru*
Багаманшина Анастасия Викторовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *tkachenko_a_v@bk.ru*
Багрянская Елена Григорьевна	Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск *agbagryanskaya@nioch.nsc.ru*
Байков Иван Константинович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *ivan_baykov@mail.ru*
Баклаушев Владимир Павлович	ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва *serpoff@gmail.com*

Баранова
Светлана Владимировна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
swb@niboch.nsc.ru

Бардашева
Алевтина Владимировна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
herba12@mail.ru

Батлук
Ульяна Ивановна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
uly-96@yandex.ru

Баулина
Наталья Михайловна
ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва
tati.90@mail.ru

Беловежец
Татьяна Николаевна
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск
ochotanya@gmail.com

Белоглазова
Марина Владимировна
АО «НПО «Микроген», Москва

Бобровский
Павел Александрович
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва
pbobrovskiy@gmail.com

Боковая
Ольга Васильевна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
olga.vasilievna@inbox.ru

Большаков
Антон Дмитриевич
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Борисова
Мария Александровна
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск
zolotykh@bionet.nsc.ru

Брагина
Елена Юрьевна
Научно-исследовательский институт медицинской генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск
bragina@ssmu.ru

Брылёв
Владимир Анатольевич
Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва
v.brylev@yandex.ru

Бунева
Валентина Николаевна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
buneva@niboch.nsc.ru

Буркова Евгения Евгеньевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *burkova_evgeniya_e@mail.ru*
Варижук Анна Михайловна	ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва *annavarizhuk@gmail.com*
Василисков Вадим	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва *mknz@inbox.ru*
Васильева Наталья Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *nataly_vas@bk.ru*
Васиховская Валерия Александровна	Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск *vasikhovskaya_v@mail.ru*
Веньяминова Алия Гусейновна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *ven@niboch.nsc.ru*
Верлов Николай Александрович	НИЦ «Курчатовский институт»-ПИЯФ, Ленинградская обл., г. Гатчина *verlov_na@pnpi.nrcki.ru*
Виноградов Дмитрий	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Вишнивецкий Сергей Николаевич	ООО «Биосан»/ООО «Биолабмикс», Новосибирск
Власов Валентин Викторович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *vvv@niboch.nsc.ru*
Воевода Михаил Иванович	НИИТПМ - филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск *mvoevoda@ya.ru*
Волчо Константин Петрович	Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск v*olcho@nioch.nsc.ru*
Воробьева Мария Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *maria.vorobjeva@gmail.com*
Высоцкий Евгений Степанович	Институт биофизики СО РАН, Красноярск *eugene.vysotski@gmail.com*
Габибов Александр Габибович	Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва *gabibov@mx.ibch.ru*

Галямова
Мария Рашитовна
АО «Технопарк Новосибирского Академгородка», Новосибирск
galyamova@academpark.com

Гарафутдинов
Равиль Ринатович
ИБГ УФИЦ РАН, Уфа
garafutdinovr@gmail.com

Генералов
Владимир Михайлович
ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, НСО, р.п.Кольцово
general@vector.nsc.ru

Гладких
Даниил Викторович
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
medulla35@gmail.com

Говорун
Вадим Маркович
ФНКЦ физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства, Москва
info@rcpcm.org

Голомидова
Алла Константиновна
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва
alla_golomidova@mail.ru

Голота
Ольга Викторовна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
olia.golota@mail.ru

Голубицкая
Екатерина Андреевна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
katerinagolubitskaya@gmail.com

Голышев
Виктор Михайлович
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
golyshevvictor@gmail.com

Гончарова
Елена Павловна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
egn@niboch.nsc.ru

Горбунова
Екатерина Андреевна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Горчаков
Андрей Александрович
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

Графская
Екатерина Николаевна
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва
grafskayacath@gmail.com

Григорьева
Алина Евгеньевна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
a.e.grigoreva@gmail.com

Грошева Екатерина	Merck, Москва
Давлетгильдеева Анастасия Тимуровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *davleta94@mail.ru*
Даниленко Валерий Николаевич	Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва *valerid@vigg.ru*
Данилин Николай Александрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *n.danilin@g.nsu.ru*
Дворникова Антонина Павловна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *antdovgerd@gmail.com*
Дегтерев Максим Борисович	ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум»
Держалова Алина Шарафидиновна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Дмитриева Мария Денисовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *imaria819@gmail.com*
Дмитриенко Елена Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *elenad@niboch.nsc.ru*
Довыденко Илья	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *dovydenko.il@gmail.com*
Донцова Ольга Анатольевна	Институт Физико-Химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ
Дырхеева Надежда	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *dyrkheeva.n.s@gmail.com*
Дьяков Илья Николаевич	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва *dyakov.ilya@gmail.com*
Дюдеева Евгения Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Епанчинцева Анна Валерьевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *annaepanch@gmail.com*

Ермаков Евгений Александрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *evgeny_ermakov@mail.ru*
Ещенко Наталья Вячеславовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *eschenko96@gmail.com*
Жарков Дмитрий Олегович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *dzharkov@niboch.nsc.ru*
Жарков Тимофей Дмитриевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Жоров Михаил Игоревич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *mikzhorov@yandex.ru*
Жуков Сергей Артемович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Журавина Мария Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *zhuravina.mashaa@yandex.ru*
Журавлев Евгений Сергеевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *evgenijur@gmail.com*
Замосковцева Анастасия Алексеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Зарытова Валентина Филипповна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *zarytova@niboch.nsc.ru*
Захаревич Наталья Владимировна	Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва *zakharevich@yandex.ru*
Захарова Ольга Дмитриевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *garonna3@mail.ru*
Зацепин Тимофей Сергеевич	Сколковский институт науки и технологий, Москва *t.zatsepin@skoltech.ru*
Зеленская Елена Михайловна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *helenzlnsk@gmail.com*
Зенкова Марина Аркадьевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *marzen@niboch.nsc.ru*

Зинченко Никита Дмитриевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *nikita.zinchenko.1994@mail.ru*
Золотов Александр Михайлович	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва *baozolotov@gmail.com*
Зонов Евгений	ООО «Диаэм», Москва
Зубавичус Ян Витаутасович	Институт катализа СО РАН, Новосибирск *yvz@catalysis.ru*
Иванисенко Никита Владимирович	ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск *ivanisenko@bionet.nsc.ru*
Иванов Павел Александрович	Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва *ivanovpa@mail.ru*
Ивченко Светлана Николаевна	ООО «Химмед Сибирь», Новосибирск
Ильина Елена Николаевна	ФНКЦ физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства, Москва *ilinaen@gmail.com*
Карелина Ульяна Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *uljana@ngs.ru*
Кашталап Василий Васильевич	НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово *V_kash@mail.ru*
Кириллова Юлия Геннадьевна	Институт тонких химических технологий МИРЭА - Российский технологический университет, Москва *pna-mitht@yandex.ru*
Клабенкова Кристина Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *secretary@niboch.nsc.ru*
Кладова Ольга Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *kladova@niboch.nsc.ru*
Клименко Александра Олеговна	ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск *secretary@niboch.nsc.ru*
Климина Ксения Михайловна	Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва *ppp843@yandex.ru*

Ковалева
Анна Ярославовна
Институт медицины и психологии В. Зельмана НГУ, Новосибирск
a.kovaleva@inbox.ru

Коваль
Владимир Васильевич
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
koval@niboch.nsc.ru

Коваль
Ольга Александровна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск о.
koval@niboch.nsc.ru

Ковтун
Алексей Сергеевич
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва
kovtunas@mail.ru

Кожевникова
Елена Николаевна
Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины, Новосибирск
e_zeste@yahoo.com

Кожевникова
Оюна Суранзановна
ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск
oidopova@bionet.nsc.ru

Колосова
Евгения Андреевна
ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, НСО, р.п.Кольцово
kurchanovaea@gmail.com

Колпаков
Федор Анатольевич
Институт вычислительных технологий СО РАН, Новосибирск
fkolpakov@gmail.com

Компанеец
Иван Юрьевич
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
secretary@niboch.nsc.ru

Король
Олег Владимирович
ООО «РЕОЛГРЕЙД СЕРВИС»

Кострюкова
Елена Сергеевна
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва
el-es@yandex.ru

Котова
Дарья Андреевна
Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва
kotovadaria95@gmail.com

Кох
Наталья Викторовна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
natalikokh@gmail.com

Кочнева
Галина Вадимовна
Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск
g.v.kochneva@yandex.ru

Красильников Игорь Викторович — Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток, Санкт-Петербург
kiv06@gmail.com

Красицкая Василиса Валерьевна — Институт биофизики СО РАН, Красноярск
vasilisa.krasitskaya@gmail.com

Крумкачева Олеся — International Tomography center SB RAS, Новосибирск
olesya@tomo.nsc.ru

Кузнецов Никита Александрович — Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Nikita.Kuznetsov@niboch.nsc.ru

Кулигина Елена Владимировна — Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
kuligina@niboch.nsc.ru

Куликов Евгений Евгеньевич — Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва
eumenius@gmail.com

Купрюшкин Максим Сергеевич — Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
kuprummax@gmail.com

Лаврик Ольга Ивановна — Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
lavrik@niboch.nsc.ru

Лазарев Василий Николаевич — Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва
lazarev@rcpcm.org

Лапа Сергей Анатольевич — Институт Молекулярной Биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва
lapa_sergey@mail.ru

Лаптева Юлия Сергеевна — Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пущино
lapteva.julia@gmail.com

Латыева Олеся Олеговна — ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва
olatyeva94@gmail.com

Левина Ася Сауловна — Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
levina@niboch.nsc.ru

Лемза Анна — Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
emza.ae@yandex.ru

Летаров
Андрей Викторович
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ биотехнологии РАН, Москва
letarov@gmail.com

Летарова
Мария Анатольевна
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва
letarova.maria@gmail.com

Лимборская
Светлана Андреевна
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва
limbor@img.ras.ru

Лифшиц
Галина Израилевна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Логашенко
Евгения Борисовна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
evg_log@niboch.nsc.ru

Ломзов
Александр Анатольевич
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
lomzov@niboch.nsc.ru

Лукьянчикова
Наталья Вильевна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
lunata9@yandex.ru

Манакова
Рената
ООО «РЕОЛГРЕЙД СЕРВИС»

Марков
Андрей Владимирович
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
andmrkv@gmail.com

Марков
Олег Владимирович
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
markov_ov@niboch.nsc.ru

Маркова
Светлана Владимировна
Институт биофизики СО РАН, Красноярск
smarkova@mail.ru

Марсова
Мария Викторовна
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва
masha_marsova@mail.ru

Матвеева
Вера Александровна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
vam@niboch.nsc.ru

Матюшкина
Дарья Сергеевна
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва
d.matyushkina@gmail.com

Мещанинова
Мария Ивановна
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
mesch@niboch.nsc.ru

Миронова Надежда Львовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *mironova@niboch.nsc.ru*
Мирошниченко Светлана Константиновна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *sveta-mira@yandex.ru*
Мифтахов Ринат	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва *mr.miftahov20@yandex.ru*
Михайлов Сергей Николаевич	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва *smikh@eimb.ru*
Михеев Алексей Александрович	ФГУП НЦ СИГНАЛ, Москва *aa-mixeev@mail.ru*
Михеева Елена Валериевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *korobova_lena@mail.ru*
Моор Нина Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *moor@niboch.nsc.ru*
Морозова Вера Витальевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *morozova@niboch.nsc.ru*
Мохамед Ислам Сабер Еад	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *islamsaber90@yahoo.com*
Мэйлин Ван	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Пекин
Науменко Константин	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *k-naumenko@mail.ru*
Невинский Георгий Александрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *nevinsky@niboch.nsc.ru*
Нетёсов Сергей Викторович	Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск *svn15@hotmail.com*
Новопашина Дарья Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *danov@niboch.nsc.ru*

Овчеренко Сергей Сергеевич	Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск *ovcherenkoserjy@gmail.com*
Огнивцев Александр Александрович	Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва *alex-ogg@yandex.ru*
Орлов Михаил	ИБК РАН, Пущино *orlovmikhailanat@gmail.com*
Ощепкова Анастасия Леонидовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *alekseeva.2009@gmail.com*
Павлов Виталий Викторович	ННИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л.Цивьяна МЗ РФ, Новосибирск *tikunova@niboch.nsc.ru*
Павлова Анна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *annivany@gmail.com*
Патрушев Дмитрий Эдуардович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Патутина Ольга Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *patutina@niboch.nsc.ru*
Переверзев Иван Максимович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Пестряков Павел Ефимович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *secretary@niboch.nsc.ru*
Петрусева Ирина Олеговна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *irapetru@niboch.nsc.ru*
Плешков Дмитрий Николаевич	ООО «Техноинфо», Москва
Повещенко Ольга Владимировна	НИИКЭЛ - филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск *poveschenkoov@yandex.ru*
Позмогова Галина Евгеньевна	ФНКЦ ФХМ ФМБА, Москва *pozmge@gmail.com*
Полежаева Ольга Анатольевна	ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, НСО, р.п.Кольцово *biopolezhaeva@gmail.com*

Полетаев Александр Борисович — Медицинский Исследовательский Центр «Иммункулус», Москва, *a-b-poletaev@yandex.ru*

Польшаков Владимир Иванович — Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, *vpolsha@mail.ru*

Полякова Светлана Игоревна — ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, *polyakova1963@list.ru*

Понасенко Анастасия Валериевна — НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, *ponasenkoav@list.ru*

Пономарева Анастасия Алексеевна — Томский НИМЦ, Томск, *anastasia-ponomaryova@rambler.ru*

Попов Александр Викторович — Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, *apopov@niboch.nsc.ru*

Порываева Алёна Васильевна — Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, *A.volkovaniboch@gmail.com*

Прасолов Владимир Сергеевич — Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, *prassolov45@mail.ru*

Прохорова Дарья — Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, *prohorova1994@gmail.com*

Пурвиньш Лада Вольдемаровна — Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, *ladapurvinsh13@gmail.com*

Пучков Павел Анатольевич — МИРЭА - Российский технологический университет, Москва, *puchkov_pa@mail.ru*

Пыхтина Мария Борисовна — НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, *pykhtina_maria@mail.ru*

Пышная Инна Алексеевна — Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, *pyshnaya@niboch.nsc.ru*

Пышный Дмитрий Владимирович — Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, *pyshnyi@niboch.nsc.ru*

Пятков Константин Иванович	Сколковский институт науки и технологий, Москва *k.piatkov@skoltech.ru*
Ракшун Яков Валерьевич	Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, Новосибирск *ya.v.rakshun@inp.nsk.su*
Репкова Марина Николаевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *repk56@mail.ru*
Речкунова Надежда Ивановна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *nadyarec@niboch.nsc.ru*
Рихтер Владимир Александрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *richter@niboch.nsc.ru*
Романенко Маргарита Владимировна	Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск *tarasovamv@gmail.com*
Романов Владимир Павлович	НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, Новосибирск vprom@mail.ru
Рубальский Евгений Олегович	Department of Cardiothoracic, Transplantation and Vascular Surgery Hannover Medical School (MHH), Ганновер *Rubalskii.Evgenii@mh-hannover.de*
Рыкова Елена Юрьевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *rykova.elena.2014@gmail.com*
Рябинин Андрей Александрович	Институт биологии развития РАН им. Н. К. Кольцова, Москва *andrey951233@mail.ru*
Рябчикова Елена Ивановна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Савин Иннокентий Андреевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *kesha_savin@mail.ru*
Савиновская Юлия Ивановна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *yulya_savinovskaya@mail.ru*
Сафатов Александр Сергеевич	ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, НСО, р.п.Кольцово *safatov@vector.nsc.ru*

Седых Сергей Евгеньевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *sirozha@gmail.com*
Семенов Дмитрий Владимирович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *semenov@niboch.nsc.ru*
Семиколенова Ольга Андреевна	Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск *danov@niboch.nsc.ru*
Сенькова Александра Васильевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *alsenko@mail.ru*
Сизова Мария Александровна	Новосибирский государственный университет, Новосибирск *m.sizova@g.nsu.ru*
Сингатулина Анастасия Шавкатовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *lasty@ngs.ru*
Слепухина Анастасия Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *Creobrain@gmail.com*
Слесарчук Никита Андреевич	Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва *n.slesarchuk@ichto.org*
Слинченко Дмитрий Игоревич	ООО «Эппендорф Раша»
Смирнов Иван Витальевич	Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва *ivansmr@inbox.ru*
Соболева Светлана Евгеньевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *soboleva@niboch.nsc.ru*
Спирин Павел Владимирович	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва *discipline82@mail.ru*
Ставчанский Василий Васильевич	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва *bacbac@yandex.ru*
Староселец Ярослав	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *staroselec@ngs.ru*

Степанов Виктор Геннадьевич	Лаборатория структуры и функции рибосом, Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск *vstepanov@uh.edu*
Степанов Григорий Александрович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *stepanovga@niboch.nsc.ru*
Суворов Александр Николаевич	ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург *Alexander_suvorov1@hotmail.com*
Танкевич Мария Васильевна	ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва *maryamitht@mail.ru*
Таранин Александр Владимирович	Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск *taranin@mcb.nsc.ru*
Тикунова Нина Викторовна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *tikunova@niboch.nsc.ru*
Толмачева Анна Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *_anny_@mail.ru*
Трифонова Екатерина Александровна	Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск *trifonova.k@rambler.ru*
Троицкая Ольга Сергеевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *troitskaya_olga@bk.ru*
Тупицына Анастасия	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *aysa@ngs.ru*
Тысченко Светлана Вячеславовна	ООО «Биосан»/ООО «Биолабмикс», Новосибирск
Тюгашев Тимофей Евгеньевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *tyugashev@niboch.nsc.ru*
Угрюмов Михаил Вениаминович	Центр исследования мозга РАН, Москва *mugrumov@mail.ru*
Уфимцева Елена Геннадьевна	НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, Новосибирск *ufim1@ngs.ru*

Федорова Ольга Семеновна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *edorova@niboch.nsc.ru*
Филатов Александр Васильевич	ГНЦ Институт иммунологии ФМБА РФ, Москва *avfilat@yandex.ru*
Филатов Антон Владимирович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *01111000@mail.ru*
Фоменко Виктория Константиновна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *fom.nin198@mail.ru*
Цедик Евгения Викторовна	ООО «Техноинфо», Москва
Чагуева Елена Николаевна	ООО «Компания Хеликон», Москва
Чепурнова Татьяна	ООО «Диаэм», Москва
Черепанова Анна Витальевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *a_cher@niboch.nsc.ru*
Черников Иван Вячеславович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск с *hernikovivanv@gmail.com*
Черноловская Елена Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *elena_ch@niboch.nsc.ru*
Черноносов Александр Анатольевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *alexander.chernonosov@niboch.nsc.ru*
Черных Елена Рэмовна	ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск *ct_lab@mail.ru*
Чечушков Антон Владимирович	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *achechushkov@gmail.com*
Чиглинцева Дарья Александровна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *dashachiglintseva@gmail.com*
Чубаров Алексей Сергеевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *chubarovalesha@mail.ru*

Чумаков Петр Михайлович	Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва *chumakovpm@yahoo.com*
Шатунова Елизавета Андреевна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *lizashatunova@yandex.ru*
Шевелев Георгий Юрьевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *shevelev@niboch.nsc.ru*
Шершов Валерий Евгеньевич	Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва *shershov@list.ru*
Широков Дмитрий Алексеевич	Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агенства, Москва *dmitry.a.shirokov@gmail.com*
Шлихт Анатолий Григорьевич	Дальневосточный Федеральный Университет, Владивосток *schliht@mail.ru*
Штам Татьяна Александровна	НИЦ «Курчатовский институт»-ПИЯФ, Ленинградская обл., г. Гатчина *Shtam_TA@pnpi.nrcki.ru*
Щербаков Дмитрий	ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, НСО, р.п. Кольцово *dnshcherbakov@gmail.com*
Юдкина Анна Владимировна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *yudkinaanya@gmail.com*
Юнес Роман Абдаллаевич	Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва *roman_182@hotmail.com*
Юсубалиева Гаухар Маратовна	Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва *kakonya@gmail.com*
Яковлев Данила Алексеевич	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск *yakovlevd@niboch.nsc.ru*
Яковлева Кристина Игоревна	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Ямпольский Илья Викторович	Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва *ivyamp@gmail.com*

БИОТЕХНОЛОГИЯ – МЕДИЦИНЕ БУДУЩЕГО

Материалы всероссийской мультиконференции
с международным участием

Подисано в печать 17.06.2019. Формат 70x100/16. Гарнитура Minion Pro
Печать офсетная. Усл. печ. л. 16,13. Тираж 300 экз. Заказ №313

Отпечатано в ООО «Офсет-ТМ»
630117, Новосибирск, ул. Арбузова, 4/27
т.: (383) 332-72-12. Email: ofsetn@yandex.ru