

**УЧЕБНО-НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки
Института биоорганической химии
им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова
Российской академии наук**

**XXVII зимняя молодежная научная школа
«ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И BIOTEХНОЛОГИИ»**

Москва, 9-12 февраля 2015 г.

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

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

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

Составители: Потапенко Н.А., Стукачева Е.А.
Компьютерная верстка: Черняев Г.А., Яковлева Т.И.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

Отпечатано на полиграфическом участке ИБХ РАН
Печать офсетная. Печ. л. 22,5. Тираж 180 экз.

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 2015 г.

ЭНДОКАННАБИНОИДЫ И ЭНДОВАНИЛОИДЫ: КАК ЛИПИДЫ ЗАЩИЩАЮТ НАС ОТ РАКА

Акимов М.Г., Безуглов В.В.

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

Электронный адрес: akimovmike@yandex.ru

Эндоканнабиноиды и эндованилоиды - это эндогенные сигнальные молекулы липидной природы, которые представляют собой конъюгаты биогенных аминов (этаноламин, дофамин, серотонин, аминокислоты) или спиртов (глицерин, этаноламин) и длинноцепочечных, часто полиненасыщенных жирных кислот (олеиновая, арахидоновая, докозагексаеновая). В связи с тем, что значительную часть своей активности данные вещества проявляют в рамках нервной системы, предложено объединять их под общим названием "нейролипиды". Обнаруженная в организме концентрация ацилдофаминов находится в диапазоне 1-6 нМ, ацилэтаноламидов 1-100 нМ, и только для 2-арахидоноил глицерина она достигает 20 мкМ. Наиболее изученные мишени нейролипидов - ванилоидный рецептор TRPV1 и каннабиноидные рецепторы CB1 и CB2, однако, описано их взаимодействие и с другими мишенями - дофаминовыми рецепторами, PPAR-гамма, кальциевыми и калиевыми каналами и др.

Особенностью нейролипидов является их разнонаправленное действие, которое зависит от состояния клетки-мишени: они способны подавлять функции некоторых клеток иммунной системы, обладают нейропротекторными и антиоксидантными свойствами, защищая нормальные клетки в стрессовых условиях, но при этом подавляют пролиферацию раковых клеток различного тканевого происхождения, в том числе *in vivo*. Для дофаминовых нейролипидов (эндованилоидов) характерно не только цитостатическое, но и цитотоксическое действие; в некоторых случаях зафиксирована индукция аутофагии. Особый интерес в данном контексте эндованилоидам придает их способность ингибировать рост раковых стволовых клеток. Как правило, при исследовании на клеточных моделях противораковая активность нейролипидов проявляется в диапазоне концентраций от 1 до 50 мкМ. Помимо ингибирующего действия собственно на опухолевые клетки, эндоканнабиноиды подавляют неоангиогенез и миграцию клеток, тем самым воздействуя практически на все стадии онкогенеза.

В контексте описанных выше данных чрезвычайно привлекательной выглядит гипотеза о существовании липидного компонента противораковой защиты организма, в рамках которого нейролипиды секретируются, предположительно, APUD-клетками в ответ на изменения микроокружения под действием трансформированных клеток и подавляют размножение последних. Однако, пока что данная гипотеза остается достаточно дискуссионной. С одной стороны, в недавней работе описана секреция эндованилоидов предшественниками нервных клеток в ответ на возникновение нейробластомы; данная реакция обеспечивает ликвидацию опухоли. С другой стороны, для нейролипидов характерно так называемое двухфазное действие:

в отличие от микромолярных, субмикромолярные концентрации (более часто встречающиеся *in vivo*) эндоканнабиноидов стимулируют пролиферацию любых клеток, а эндованилоидов - индуцируют дифференцировку, по крайней мере, в культурах глиомы и феохромоцитомы крысы.

Следует отметить, что для нейрוליпинов характерна низкая неспецифическая токсичность: она зафиксирована только для ацилдофаминов в концентрациях более 30-50 мкМ. В сочетании с антиноцицептивными свойствами это делает данные молекулы привлекательными для разработки новых противораковых препаратов на их основе.

Таким образом, нейрוליпины представляют собой новое поле для поиска средств для борьбы с раком. С одной стороны, на их основе могут быть созданы новые цитотоксические и цитостатические препараты с низким уровнем побочного действия, с другой - дальнейшие исследования липидного компонента противораковой защиты могут выявить мишени для действия на ранние стадии опухолевого процесса. Работа частично поддержана грантом РФФИ № 14-04-00110а.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛИПОСОМ, НЕСУЩИХ ЛИГАНД СЕЛЕКТИНОВ, С ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ СОСУДОВ КРОВИ

Алексеева А.С.¹, Кузнецова Н.Р.¹, Капкаева М.Р.², Щегловитова О.Н.², Степанова Е.В.³, Бовин Н.В.¹, Водовозова Е.Л.¹

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

² НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

³ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Электронный адрес: anna@lipids.ibch.ru

Ранее в лаборатории химии липидов ИБХ РАН разработаны стабильные 100-нм липосомы на основе природных фосфолипидов и липофильного пролекарства алкилирующего агента мелфалана. Липосомы могут быть оснащены лигандом селективных - тетрасахаридом SiaLe^x. Селективные экспрессируются на активированных лейкоцитах, тромбоцитах и эндотелиальных клетках; они играют ключевую роль в развитии воспаления и метастазирования и служат перспективной мишенью для доставки лекарств. На модели карциномы легкого Льюис при в/в введении нами показан специфический антиваскулярный эффект SiaLe^x-липосом, который приводил к усилению торможения роста опухоли по сравнению с лечением липосомами без вектора. Липосомы имели различную картину распределения в опухоли - SiaLe^x-липосомы, в основном, локализовались на эндотелии сосудов, а ненацеленные липосомы накапливались в опухолевых клетках и в межклеточном пространстве периваскулярной области опухоли (для визуализации липосом бислой метили флуоресцентным зондом) [1]. Влияние введения SiaLe^x-лиганда на взаимодействие липосом с клетками эндотелия *in vitro* исследовано нами на первичных культурах эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC). Клетки активировали ФНО-α и оценивали уровень экспрессии E-селектина. По данным проточной цитометрии, связывание и поглощение липосом активированными HUVEC росло пропорционально содержанию SiaLe^x-конъюгата, а неактивированные клетки сохраняли низкий уровень сигнала. Специфичность связывания с E-селектином доказана конкурентным ингибированием антителами. Активированные клетки быстро связывали и поглощали SiaLe^x-липосомы, что сопровождалось дестабилизацией мембраны липосом и, следовательно, - высвобождением пролекарства. Неактивированные HUVEC связывали незначительное количество SiaLe^x-липосом, и последние сохраняли свою целостность в ходе всего наблюдения (90 мин). Полученные данные свидетельствуют о селективности действия SiaLe^x-липосом на активированные эндотелиальные клетки [2].

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-00069.

Литература

1. Kuznetsova et al. J. Drug Targeting 2014, 22(3), 242-250.
2. Alekseeva et al. BBA-Biomembranes 2015, in press.

ВЛИЯНИЕ ИМУНОФАНА НА КРАТКОСРОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЯ *IN VITRO*

Аронов Д.А., Антипова Н.В., Петрова Т.Д., Султанов Д.Ч., Семущина С.Г., Мoiseeva Е.В.

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

В России разрешены к использованию более 40 иммуномодуляторов (ИМ), например, Имунофан® (ИмФ) уже применяется в клинике рака молочной железы (РМЖ) с целью коррекции иммунного статуса пациентов. Ранее мы показали, что ИмФ может стимулировать проявление и рост РМЖ мышцы в различных моделях *in vivo*. Цель данного исследования - изучить влияние ИмФ как на рост индивидуальных краткосрочных культур РМЖ, так и клеток иммунной системы мышцы *in vitro*.

Материалы и методы. Индивидуальные образцы опухоли, селезенки и регионарных лимфатических узлов (ЛУ) были получены от мышей BALB/c, CBRVi BLRВс РМЖ и гомогенизированы, полученные суспензии клеток культивировали в среде DMEM. В лунки с клетками добавили ИмФ в широком диапазоне доз (разведение от 1:10 до 1:10000), контроль культивировали без препарата. Эффект оценивали в динамике путем визуального учета количества центров роста (ЦР, скопления более 10 клеток) и количества отдельно лежащих клеток адгезионной составляющей культур под микроскопом Nikon Diaphot 300; долю живых клеток суспензионной составляющей культур определяли путем периодического забора образцов с последующей окраской трипановым синим. Достоверность различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты. Количество клеток в краткосрочных культурах, полученных из опухоли и ЛУ мыши BALB/c, было достоверно больше в обработанных ИмФ лунках по сравнению с контролем (7 день, $p < 0.01$). Количество ЦР также было больше в обработанных ИмФ культурах опухоли (14 день, $p < 0.05$). Сходные данные наблюдались в культурах мышей CBRVi BLRB, причем обработка ИмФ достоверно повышала долю живых спленоцитов BLRB.

Выводы. Было продемонстрировано стимулирующие действие ИмФ *in vitro* в используемых краткосрочных культурах РМЖ мышцы. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять, объяснялся ли стимулирующий эффект прямым действием ИмФ на опухолевые клетки, или присутствие в краткосрочной культуре клеток микроокружения (фибробласты, макрофаги и др.) опосредовало эффект. Однако, продемонстрированная возможность стимуляции опухоли в моделях РМЖ как *in vitro*, так и *in vivo* должна предостеречь от бесконтрольного применения иммуномодуляторов в онкологической клинике.

УБИКВИТИН-НЕЗАВИСИМЫЙ ПРОТЕОЛИЗ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА ПРОТЕАСОМОЙ И ЕГО РОЛЬ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

Белогуров А.А., Габибов А.Г.

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

Рассеянный склероз (РС) - это системное аутоиммунное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы человека, характеризующееся множественными повреждениями белого вещества. Среди главных аутоантигенов при РС выделяют несколько белков миелиновой оболочки, в том числе основной белок миелина (МВР), в значительных количествах присутствующий в мембране олигодендроцитов. В процессе метаболизма внутриклеточный протеолиз МВР может происходить под действием различных протеаз, а также мультикаталитического протеиназного комплекса - протеасомы. Абсолютное большинство белков разрушаются 26S протеасомой по убиквитин-зависимому пути. Нами было установлено, что МВР принадлежит к крайне малочисленной группе белков, способных подвергаться протеолизу 26S протеасомой в отсутствие молекул убиквитина. Молекулярный механизм гидролиза МВР включает в себя зарядопосредованное связывание с субъединицей Rpn10 регуляторной 19S субчастицы. Протеасома является главным протеолитическим комплексом, генерирующим пептиды, презентируемые на поверхности клетки в контексте комплексов гистосовместимости I класса. Отсутствие контроля за гидролизом МВР со стороны системы убиквитинилирования означает, что качественный и количественный спектры пептидов МВР, презентируемых на поверхности олигодендроцитов, практически полностью определяются каталитическими субъединицами протеасомы. Нами было установлено, что при развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ) - животной модели рассеянного склероза - в головном мозге иммунизированных животных конститутивная протеасома в значительной степени замещается иммунопротеасомой, при этом иммуносубъединица $\beta 1i$ локализуется преимущественно в олигодендроцитах. Показано, что повышенное содержание иммунопротеасомы в головном мозге мышей с ЕАЕ приводит к образованию повышенного количества ряда патогенных пептидов МВР, включая пептид ENPVVHFF, являющийся частью энцефалитогенного региона МВР. Активированные CD8+ Т-клетки, специфичные к данному пептиду, эффективно лизировали олигодендроциты, обработанные интерферон-гамма. Специфический ингибитор иммуносубъединицы $\beta 1i$ селективно воздействовал на иммунопротеасому *in vitro*, а также эффективно подавлял развитие ЕАЕ *in vivo* у экспериментальных животных. Полученные факты указывают на возможную связь между убиквитин-независимой протеолитической активностью иммунопротеасомы в отношении основного белка миелина и развитием рассеянного склероза, а также на перспективность специфических ингибиторов иммунопротеасомы как потенциальных лекарственных средств.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 14-14-00585 "Молекулярный механизм убиквитин-независимого протеолиза белков протеасомой и его роль в норме и патологии".

СОЗДАНИЕ БЕЛКОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХ ФЛУОРОГЕНЫ, ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕЧЕНИЯ ЖИВЫХ СИСТЕМ

Божанова Н.Г., Баранов М.С., Лукьянов К.А., Мишин А.С.

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

Предложенные в последние годы новые методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения позволяют существенно улучшить качество получаемой информации, но предъявляют дополнительные требования к флуоресцентным меткам. В качестве меток могут быть использованы как некоторые флуоресцентные белки, так и ряд химических соединений. Флуоресцентные белки - генетически кодируемые метки, однако они уступают флуоресцентным красителям по скорости эмиссии. Химические флуорогены имеют во многом лучшие характеристики, но не могут быть синтезированы клеткой в заданном месте. Возможным решением проблемы отсутствия хороших генетически кодируемых меток для современных методов микроскопии сверхвысокого разрешения являются белки, способные связывать флуорогены.

В нашей лаборатории ранее был синтезирован ряд флуорогенов, обладающих флуоресценцией в видимой области спектра, но имеющих низкий квантовый выход в воде. Ограничение внутримолекулярной подвижности таких флуорогенов при специфическом связывании со специально разработанным белком (генетически кодируемой меткой) может повышать их квантовый выход.

В качестве белка нами был выбран липокалин B1c из *E.coli*, содержащий лиганд-связывающий карман подходящего размера. Было проведено моделирование структур более 90 тысяч мутантов по позициям, боковые цепи аминокислотных остатков в которых формируют лиганд-связывающий карман липокалина. По результатам моделирования взаимодействия с 6 низкомолекулярными флуорогенами было выбрано, синтезировано и выделено 32 белка, большинство из которых действительно продемонстрировало связывание с флуорогенами, приводящее к увеличению квантового выхода флуоресценции. На основе полученных данных мы выбрали два белка и три флуорогена, которые были подробно охарактеризованы. Показано обратимое связывание белков с флуорогенами *in vitro* ($K_d=0.1-10 \times 10^{-6}$ М), приводящее к увеличению квантового выхода флуоресценции до 100 раз и, в некоторых случаях, - к изменению спектра эмиссии флуоресценции. Белки слияния с белками цитоскелета в клетках линии HeLa Kyoto демонстрировали ожидаемую локализацию. При добавлении флуорогенов наблюдалось быстрое обратимое окрашивание целевых структур. Таким образом, разработанные белки могут быть использованы в качестве новой генетически кодируемой метки для современных видов флуоресцентной микроскопии.

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА МОНООКСИГЕНАЗ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: CYP124 И CYP136

Василевская А.В., Шкель Т.В., Гилеп А.А.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск
Электронный адрес: vasilevskaya@iboch.bas-net.by

Туберкулез - бактериальная инфекция, которой ежегодно заболевает 8 миллионов человек, из них 2 миллиона умирают от осложнений. Существующие противотуберкулезные препараты разработаны несколько десятилетий назад, и использование их для лечения форм микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью оказалось неэффективным. На сегодняшний день принципиально важным является поиск новых мишеней действия противотуберкулезных препаратов. В качестве перспективной мишени рассматриваются цитохромы P450 микобактерий. Цитохромы P450 (P450) выполняют ключевые функции в метаболизме микобактерий и потенциально могут участвовать в деградации большинства противотуберкулезных препаратов.

Геном микобактерий туберкулеза содержит 20 различных P450. Накопление информации о P450 микобактерий может способствовать процессу создания новых противотуберкулезных препаратов и выяснению роли данных ферментов в жизнедеятельности и патогенезе микобактерий. В данной работе получены и изучены каталитические свойства нескольких ферментов, представляющих наибольший интерес: CYP124 и CYP136.

CYP124 - фермент, метаболизирующий холестерин человека. Эксперименты по определению каталитической активности продемонстрировали, что в результате гидроксилазной активности образуются моногидроксипроизводные стероидов и секостероидов. Также впервые показано, что фермент *M. tuberculosis* может метаболизировать провитамин D₃ (7-дегидрохолестерин) и витамин D₃, что приводит к инаktivации предшественников витамина D₃, тем самым влияя на гомеостаз хозяина.

CYP136 - один из наиболее консервативных цитохромов P450 микобактерий. В настоящей работе впервые проведены клонирование, экспрессия в *E. coli* и получение в высокоочищенном состоянии цитохрома CYP136. Проведен поиск возможных субстратов и показано взаимодействие CYP136 с метилразветвленными липидами, а также жирными кислотами, участвующими в образовании клеточной стенки микобактерий.

С целью поиска потенциальных ингибиторов P450 изучено взаимодействие CYP124 и CYP136 с препаратами азолов, обладающих фунгицидным действием. Выявлено эффективное связывание препаратов эконазола и клотримазола, обладающих микобактериальной активностью, превышающей активность известного противотуберкулезного препарата - изониазида.

Данное исследование показало, что CYP124 и CYP136 могут быть потенциальными мишенями действия новых противотуберкулезных препаратов.

ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ ТОКСИНОВ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНСТРУМЕНТОВ В НЕЙРОБИОЛОГИИ

Василевский А.А.

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

Любимый тезис ученых, занимающихся токсинами, гласит: токсины - высокоточные и эффективные инструменты исследования их молекулярных и клеточных мишеней. Сами исследования часто направлены на получение таких инструментов для дальнейших исследований. Очевидно при этом, что далеко не каждый токсин становится исследовательским инструментом и даже рассматривается в таком качестве.

В докладе я хотел бы привести примеры "состоявшихся инструментов" - непосредственного использования токсинов в изучении структуры или функции белков, а также механизма протекания физиологических процессов. Я постараюсь показать примеры из разных областей, но основное внимание будет уделено нервной системе, использованию нейротоксинов для изучения структуры и функции нейрорецепторов. Постараюсь также продемонстрировать вклад отдела молекулярной нейробиологии ИБХ в формирование доступного сегодня молекулярного инструментария.

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ-МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА

Вигонт В.А., Колобкова Ю.А., Зимина О.А., Глушанкова Л.Н., Казначеева Е.В.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
Электронный адрес: vvigand@gmail.com

Болезнь Хантингтона (БХ) является аутосомно-доминантным нейродегенеративным заболеванием, вызываемым увеличением числа глутамин-кодирующих повторов в первом экзоне гена белка хантингтина. На данный момент связь между экспрессией мутантного хантингтина и процессами дегенерации нейронов до конца не ясна. Тем не менее, в последнее время появляется все больше работ, в которых патогенез нейродегенеративных заболеваний, в том числе БХ, связывают с нарушениями нейрональной кальциевой сигнализации.

Мы смоделировали БХ в различных клеточных линиях (клетки нейробластомы человека (SK-N-SH) и мышцы (Neuro2A, первичная культура нейронов стриатума мыши (MSN)) с помощью лентивирусной доставки в клетки генетического конструкта для экспрессии патологического мутантного хантингтина с длиной тракта 138 остатков глутамина (Htt138Q) или конструкта для экспрессии первого экзона мутантного белка. В качестве еще одной модели БХ использовались нейроны стриатума человека (MSN-human), дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных репрограммированием фибробластов, изолированных у пациентов с БХ.

Данные электрофизиологических экспериментов показали, что депо-управляемый вход кальция (SOCE) существенно (не менее чем в 2 раза) повышен по сравнению с контролем во всех приведенных моделях БХ.

Необходимо подчеркнуть, что в модели MSN-human мы имели дело с эндогенной экспрессией мутантного хантингтина, а также что количество остатков глутамина в тракте было всего 40-45, то есть близкое к минимальной длине тракта, при котором наблюдается манифестация заболевания. Тем не менее эффект патологического изменения SOCE, был выражен столь же сильно, как и для моделей, экспрессирующих Htt138Q.

Далее мы показали, что потенциальный терапевтический агент, соединение EVP4593, способно снижать патологический SOCE в моделях БХ на клетках SK-N-SH, MSN, а также MSN-human.

Таким образом, мы продемонстрировали, что депо-управляемый вход кальция является новой перспективной мишенью для разработки лекарств против БХ и, возможно, других нейродегенеративных заболеваний.

Работа поддержана грантами РФФИ и РФНФ, программой МКБ, стипендией Президента РФ.

НОВЫЙ МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАСТЕНИЙ И ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Виноградова С.В.^{1,2}, Баринаева Е.Д.¹, Князев А.Н.³, Арапиди Г.П.⁴,
Фесенко И.А.⁴, Закиев Е.Р.⁴, Хазигалева Р.А.⁴, Шаварда А.Л.⁵,
Игнатов А.Н.^{1,2}

¹ Центр "Биоинженерия" РАН, Москва

² Российский университет дружбы народов, Москва

³ Российский государственный аграрный университет -
МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М.
Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

⁵ Санкт-Петербургский государственный университет,
Научно-исследовательский центр ресурсов для молекулярных и
клеточных технологий, Санкт-Петербург
Электронный адрес: svetlana.vinogradova@biengi.ac.ru

Одна из актуальных проблем современной биологии - изучение взаимодействия растений и их патогенов. Мох *Physcomitrella patens* является новым модельным объектом для проведения подобных исследований, т.к. обладает несколькими преимуществами: многие клеточные и молекулярные защитные реакции *P. patens* аналогичны тем, которые представлены в цветковых растениях; геном *P. patens* секвенирован; отработана технология получения целевых мутантных линий; наличие гаплоидной фазы позволяет выявлять мутантные фенотипы без последующих анализов расщепления в потомстве. Ранее были проведены исследования взаимодействия *P. patens* с *Pectobacterium carotovorum* и грибами родов *Botrytis* и *Pythium* (De León et al., 2012; Andersson et al., 2005). Эти фитопатогены являются некротрофными и убивают клетку еще до или во время колонизации, индуцируя при этом экспрессию большого количества генов-мишеней. Исследования по взаимодействию специализированных фитопатогенов и *P. patens* не проводились.

Целью нашей работы является изучение взаимодействия *P. patens* и специализированных фитопатогенных бактерий родов *Xanthomonas* и *Pseudomonas*. Гаметофоры *P. patens* культивировали на агаризованной питательной среде Кнопа, проводили инокуляцию суспензией фитопатогенных бактерий, выделяли метаболиты и с использованием методов газовой хроматографии и масс-спектрометрии определяли состав метаболитов.

В результате показано, что бактерии *X. campestris* не вызывали защитную реакцию у *P. patens*, но стимулировали накопление соединений, необходимых для размножения бактерий в растении. Бактерии *P. syringae* были наиболее агрессивными, индуцировали накопление соединений, участвующих в системной устойчивости растений и необходимые для размножения бактерий в растениях, снижали накопление соединений, важных для местной реакции некроза. Бактерии *X. arboricola* вызывали наиболее сильное накопление важных для размножения бактерий в растениях, роста растений и системных метаболитов устойчивости.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-40104-Н.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ ХЕМОКИНОВ ЭНДОТЕЛИЕМ ЧЕЛОВЕКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ VEGF165 И HGF

Глуханюк Е.В.^{1,2}, Галлингер Ю.О.², Родина П.А.², Керова К.В.²,
Макаревич П.И.^{1,2}, Парфенова Е.В.^{1,2}

¹ Российский кардиологический научно-производственный комплекс,
лаборатория ангиогенеза, Москва

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова,
Москва

Электронный адрес: evgengluhanuk@gmail.com

В нашей лаборатории ранее показано, что комбинация генетических конструкторов, несущих гены факторов роста VEGF и HGF, является эффективной для стимуляции ангиогенеза на моделях инфаркта миокарда и ишемии нижней конечности. Кроме того установлено, что данная комбинация модулирует воспалительные события, что может быть очень важным аспектом механизма действия и влияния на общую эффективность терапии.

Методы. Анализ транскриптома и моделирование производились с помощью программы MetacoreTM. Для экспериментов *in vitro* были использованы культуры эндотелия HUVEC, TIME и EA.926hy. Стимуляция клеток производилась рекомбинантными человеческими факторами роста VEGF165, HGF и их комбинацией (в концентрации 25 нг/мл). Для оценки продукции хемокинов использовали ИФА, исследования экспрессии генов - РТ-ПЦР. Для оценки активации факторов транскрипции HIF-1/2 использовали люциферазные сенсорные векторы и siRNA, а для определения активации каскада NFκB-вестерн-блот с антителами к pIKB и IKB.

Результаты. С помощью РТ-ПЦР и ИФА нами были подтверждены данные компьютерной модели. При стимуляции клеток VEGF отмечается рост экспрессии генов и продукции MCP-1 и IL-8. При стимуляции клеток HGF наблюдался разнонаправленный эффект: экспрессия и продукция MCP-1 подавлялась, а экспрессия и продукция IL-8 - повышалась. Как следствие, при добавлении к клеткам эндотелия комбинации из двух факторов в случае MCP-1 наблюдалось подавление эффекта VEGF, а в отношении продукции IL-8 факторы роста обладали аддитивным стимулирующим действием, что приводило к достижению максимальной экспрессии гена и концентрации хемокина в среде культивирования. Анализ факторов транскрипции показал, что VEGF и HGF способны регулировать активность NFκB и HIF1/2, причем первый из них вносит наиболее значимый вклад в изменения продукции MCP-1, а второй (конкретнее - HIF-2) участвует в регуляции экспрессии гена IL-8.

Выводы.

1. Факторы VEGF и HGF модулируют экспрессию генов и продукцию таких хемокинов, как IL-8 и MCP-1.

2. VEGF модулирует сходным образом экспрессию генов и продукцию IL-8 и MCP-1, вероятно, через транскрипционный фактор NFκB.

3. В регуляции экспрессии генов и секреции IL-8 под действием HGF и VEGF существенный вклад вносит транскрипционный фактор HIF-2, возможно, через механизм негипоксической стабилизации-активации.

**СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ АП-ЭНДОНУКЛЕАЗЫ И
ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ РЕТРОТРАНСПОЗОНА Bov-B LINE
ГЕНОМА ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЯЩЕРИЦ *DAREVSKIA*
UNISEXUALIS И ДВУПОЛЫХ РОДИТЕЛЬСКИХ ВИДОВ
D. NAIRENSIS И *D. VALENTINI***

Годакова С.А.^{1,2}, Корчагин В.И.², Севастьянова Г.А.¹

¹ Московский педагогический государственный университет, Москва

² Институт биологии гена РАН, Москва

Электронный адрес: svetlana_godakova@mail.ru

Партеногенетические кавказские скальные ящерицы рода *Darevskia*, имеющие гибридное происхождение от двуполых родительских видов, являются одним из наиболее интересных представителей клонально размножающихся рептилий. Ранее были подробно исследованы и описаны ди-, три- и тетра-нуклеотидные микросателлитные локусы у однополых и двуполых представителей данного рода. Большинство особей исследованных партеновидов являются гетерозиготами и демонстрируют высокий уровень полиморфизма. Кроме тандемных повторов, в геномной клонотеке партеновида *D.unisexualis* была обнаружена консервативная по своей структуре 3'-концевая область ретротранспозона Bov-B LINE. Ретротранспозоны, как и тандемные повторы, составляют вариабельный компонент генома эукариот и обуславливают явление геномной нестабильности. В связи с этим целью работы является установление структуры Bov-B LINE в геноме ящериц партеногенетического вида *D.unisexualis* и двуполых родительских видов *D.nairensis* и *D.valentini*. Задачей данного исследования является сравнительный анализ генов АП-эндонуклеазы, обратной транскриптазы и прилежащих областей у трех видов. Нами секвенированы внутренние участки Bov-B LINE партеновида размером 1,8 т.п.н., на основе которых подобраны праймеры для ПЦР-амплификации гомологичных участков родительских видов. Определена внутригеномная вариабельность секвенированных копий Bov-B LINE у трех представленных видов, полученная методом попарного сравнения; установлено количество активных/неактивных копий генных доменов; а также проведен филогенетический анализ полученных последовательностей АП-эндонуклеазы, прилежащего домена и ревертазного гена. Дальнейшее изучение структуры, распределения и дивергенции Bov-B LINE у однополых и двуполых ящериц рода *Darevskia* может дать новую информацию о механизмах геномной нестабильности, а также расширит наши знания о возникновении и эволюции партеногенетических видов.

**БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДИСАХАРИДНЫЕ НУКЛЕОЗИДЫ.
СИНТЕЗ И СВОЙСТВА**

Дреничев М.С., Ословский В.Е.

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

Электронный адрес: mdrenichev@mail.ru

К настоящему времени из различных природных источников выделено около ста дисахаридных нуклеозидов, входящих в состав антибиотиков, т-РНК, поли(ADP-рибозы) и простетических групп некоторых ферментов.

Дисахаридные нуклеозиды и их ациклические аналоги - потенциальные ингибиторы фермента поли(ADP-рибозо)полимеразы-I (ПАРП-1), осуществляющего посттрансляционную модификацию белков в клетках эукариот и являющегося мишенью для создания новых лекарственных средств. Поли(ADP-рибоза) вовлечена в процессы модуляции структуры хроматина, репликации, транскрипции, репарации ДНК и дифференцировки клеток.

В ходе работы впервые синтезирован 3'-O-β-D-рибофуранозиладенозин, который был выделен из листьев *Arabidopsis thaliana* при бактериальном заражении *Pseudomonas syringae*. Оптимизирован метод получения природных 2'-O-α-D-рибофуранозилнуклеозидов и изучены возможности их химической модификации. Был получен ряд новых ингибиторов ПАРП-1 на основе дисахаридных нуклеозидов и их аналогов, которые были исследованы в реакции синтеза поли(ADP-рибозы), катализируемой ферментом ПАРП-1. Исследования на культуре опухолевых клеток SKOV-3 в условиях окислительного стресса (обработка перекисью водорода) показали, что 5-замещенные пиримидиновые дисахаридные нуклеозиды (R=I, Me) и их диальдегидные производные проникают в ядра клеток и ингибируют ПАРП-1. Дисахаридные нуклеозиды, в отличие от диальдегидных производных, не обладают цитотоксичностью в концентрациях до 10⁻³ М.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 14-04-31514).

**ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ПОЛИ-3-ГИДРОКСОБУТИРАТА, СИНТЕЗИРУЕМОГО
РИЗОБАКТЕРИЕЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Sp245**

Дятлова Ю.А., Тугарова А.В., Камнев А.А.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
Саратов
jdyatlova2013@yandex.ru, tugarova_anna@mail.ru, aakamnev@ibppm.sgu.ru

Поли-3-гидроксобутират (ПГБ) относится к группе полигидроксоалканоатов (ПГА) - сложных биоразлагаемых полиэфиров, к синтезу которых способны многие бактерии. Данные "резервные" соединения, накапливаемые клетками при стрессах и повышающие устойчивость бактерий, относятся к экологически чистым биопластикам и способны заменить традиционные пластмассы.

Широко распространенные и исследуемые многими научными группами фитостимулирующие бактерии вида *Azospirillum brasilense* синтезируют ПГБ и могут накапливать его до 75% от сухой биомассы. Ранее, с использованием ИК-Фурье-спектроскопии диффузного отражения, было охарактеризовано накопление ПГБ (без его выделения) клетками данного вида *in situ* [1].

Целью данного исследования явилось выделение ПГБ, синтезированного штаммом *A. brasilense* Sp245, и его характеристика методом ИК-Фурье-спектроскопии в режиме пропускания (в виде пленок). Для выращивания бактерий были выбраны условия, индуцирующие синтез до 60% ПГБ: трофический стресс, культивирование в течение 9 сут [1]. ПГБ экстрагировали хлороформом и для удаления остатков жирных кислот переосадили охлажденным метанолом.

Спектр ПГБ, хранившегося 14 мес. (ПГБ-1), был идентичен типичному спектру кристаллического ПГБ. Пик карбонильной группы ПГБ-1 наблюдался при 1723 см⁻¹, что соответствует кристаллической фазе данного полимера. На спектре ПГБ, хранившегося 2 мес. (ПГБ-2), пики карбонильной группы соответствовали как кристаллической фазе (1723-1731 см⁻¹), так и аморфной фазе (1739-1748 см⁻¹). Наблюдалось различие в механических свойствах образцов: ПГБ-1 представлял собой ломкую пленку, в то время как ПГБ-2 был более гибок и растягивался. На спектрах ПГБ-2 также присутствовали дополнительные слабые пики, соответствующие малым количествам связанной воды (при 3435 и 1684 см⁻¹), которые отсутствовали на спектрах ПГБ-1.

Таким образом, выявлено увеличение упорядоченности структуры ПГБ с течением времени в процессе кристаллизации ПГБ с удалением связанной воды, что приводит к изменению его механических свойств. Полученные результаты способствуют пониманию процессов биосинтеза ПГБ (поликонденсация с выделением H₂O) и изменений его свойств при длительном хранении.

Литература

1. Kamnev A.A., Tugarova A.V., Tarantilis P.A., Gardiner P. H.E., Polissiou M.G. Comparing poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: The effects of copper(II) // *Appl. Soil Ecol.* 2012. Vol. 61. P. 213-216. DOI: 10.1016/j.apsoil.2011.10.020.

**НАДГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ
ГЕНОВ У ПОЗВОНОЧНЫХ**

Жигалова Н.А., Шумская В.С., Женило С.В.

Центр "Биоинженерия" РАН, Москва
Электронный адрес: nzhigalova@gmail.com

Надгенетические (эпигенетические) механизмы контроля генетической информации играют важнейшую биологическую роль в таких процессах как развитие эмбриона, дифференцировка клеток, дозовая компенсация половых хромосом, развитие онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Одним из механизмов эпигенетической регуляции транскрипции является привлечение к метилированной ДНК так называемых, мети-ДНК-связывающих белков. Показано, что отсутствие одного такого белка или даже нескольких (Каизо, MeCP2, MBD2 и MBD1) белков не приводит к остановке эмбрионального развития у млекопитающих. Однако, например, появление мутаций в гене *MeCP2* является основной причиной психоневрологического наследственного заболевания - Синдрома Ретта, встречающегося почти исключительно у девочек. В нашей лаборатории активно изучают функциональную роль метил-ДНК-связывающегося белка Каизо в клетках млекопитающих. Каизо - бимодальный ДНК-связывающий белок, который способен распознавать участки, содержащие как метилированную, так и неметилованную специфическую последовательность CTGCNA (KCC - Каизосвязывающий сайт). Каизо важен для развития лягушек и рыб, например, уменьшение его количества приводит к гибели эмбрионов в результате преждевременной активации генов в бластуле. С другой стороны, удаление гена *Kaiso* у мышей не приводит к ярко выраженному фенотипу. Тем не менее, в гибридах при скрещивании мышей линий *Kaiso*-*γ* и *APC/Min* проявляется устойчивость к возникновению рака кишечника. В настоящее время внимание ученых направлено на изучение генетических и эпигенетических изменений, происходящих в процессе получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из соматических клеток млекопитающих. В нашей лаборатории была получена генетическая модель *Каизо*нокаутных животных (КО) и животных дикого типа (WT) с индуцибельной (доксициклином) кассетой, содержащей факторы Яманаки. В результате перепрограммирования мышинных эмбриональных фибробластов КО линии образовалось больше совершенных колоний ИПСК по сравнению с ИПСК дикого типа. Таким образом, метил-ДНК-связывающий белок Каизо может играть важную роль в перепрограммировании соматических клеток млекопитающих.

ХИТОЗАН – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПОЛИМЕР ДЛЯ СОЗДАНИЯ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Зубарева А.А.¹, Савина А.А.^{2,3}, Щербинина Т.С.¹, Генералов А.А.^{2,3}, Свирицевская Е.В.²

¹ Центр "Биоинженерия" РАН, Москва

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

³ МГАВМиБ, Москва

Электронный адрес: zubarevaaa@gmail.com

В последнее время число разработок в области разработки систем доставки биологически активных веществ (БАВ) увеличивается лавинообразно. В качестве матриц для создания таких систем используют различные материалы, одним из перспективных является природный полисахарид хитозан, являющийся ближайшим дезацетилированным производным природного полисахарида хитина и представляющий собой полимер, состоящий из случайно расположенных остатков глюкозамина и N-ацетилглюкозамина.

Хитозан (ХИТ) обладает рядом значительных преимуществ, в частности имеет большое количество реакционноспособных групп, что позволяет его использовать для разработки систем доставки биологически активных веществ с различными физико-химическими свойствами. Целью нашего исследования являлось изучение внутриклеточного транспорта ХИТ и наночастиц (НЧ) на его основе. В работе использовали положительно заряженные ХИТ с молекулярной массой 200 кДа и степенью дезацетилирования 86% (Х), гексаноил-хитозан со степенью замещения (СЗ) 10% (ГХ), а также отрицательно заряженный сукциноил-хитозан со СЗ 60% (СХ). НЧ из ГХ получали методом ионотропного гелеобразования, из СХ - методом солевого осаждения. Все образцы метили ФИТЦ (СЗ<1%). Анализ внутриклеточного трафика проводили на клетках MiaPaCa-2 с помощью трекеров органелл. Клетки инкубировали с хитозанами или НЧ от 30 мин до 12 ч и анализировали методом конфокальной микроскопии. Показали, что СХ и НЧ из СХ попадают преимущественно в лизосомы клетки уже спустя 30 мин и накапливаются в них при более длительных инкубациях. Совершенно другая картина наблюдается для положительно заряженных Х и ГХ, которые собираются в агрегаты на мембранах клеток, внутрь клеток проходят значительно хуже и дольше, а при попадании в клетку локализуются в лизосомах и митохондриях. Наночастицы ГХ практически не проходят в клетки.

Таким образом, в ходе работы был исследован внутриклеточный транспорт хитозана и наночастиц на его основе, что может являться предпосылкой к разработке систем доставки лекарств нового поколения, позволяющих доставить терапевтический агент специфично в лизосомы или митохондрии.

МЕТАГЕНОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОДЗЕМНОЙ БИОСФЕРЫ

Кадников В.В.¹, Франк Ю.А.², Белецкий А.В.¹, Карначук О.В.², Марданов А.В.¹

¹ Центр "Биоинженерия" РАН, Москва

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

Электронный адрес: vkadnikov@bk.ru

Одной из наименее изученных экологических ниш является подземная биосфера, где нагрев пород и пластовых вод происходит по мере приближения к магматическому ядру, что создает условия для развития термофильных микробных сообществ.

Мы исследовали микробные сообщества подземных термальных вод, доступных из двух нефтепоисковых скважин - 3Р в Парабельском районе и 1Р в пос. Белый Яр Томской области с использованием секвенирования и анализа метаномов микробных сообществ.

В результате пиросеквенирования варибельных фрагментов гена 16S рРНК было установлено, что наибольшую долю (~80%) в сообществе термальных вод скважины 3Р Парабельского района составляли бактерии филума *Firmicutes*, относящиеся к родам *Desulfoviregula* (~53%), *Desulfotomaculum* (~12%) и *Thermacetogenium* (~8%). Гидрогенотрофные метаногены рода *Methanothermobacter* представляли архейную часть сообщества. На основании анализа состава микроорганизмов и набора присутствующих в метагеноме генов можно сделать вывод о том, что сообщество термальных вод скважины 3Р характеризуется преимущественно хемолитоавтотрофным метаболизмом, в основе которого лежат процессы окисления водорода, сопряженные с восстановлением сульфата. Гидролиз поступающих извне высокополимерных соединений может осуществляться минорными компонентами сообщества - бактериями *Thermacetogenium* и другими фирмикутами, не способными к сульфат редукации, а также бактериями других групп, например, *Ignavibacteriae*, *Planctomycetes* и *Chloroflexi*, обнаруженными при анализе состава сообщества по варибельным фрагментам генов 16S рРНК. В результате пиросеквенирования в скважине 1Р было выявлено присутствие различных микроорганизмов (*Chloroflexi*, *Nitrospira*, *Deltaproteobacteria* и *Firmicutes*), а также были обнаружены контиги, близкие к *Desulforudis audaxviator*, который ранее был обнаружен в качестве "одновидовой" экосистемы в золотодобывающей шахте Южной Африки.

МОДЕЛИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ БЕЛКОВ ОБОЛОЧКИ ФЛАВИВИРУСОВ

Козловская Л.И.¹, Осолодкин Д.И.^{1,2}, Диева Е.В.^{1,2}, Орлов А.А.^{1,2},
Палиолин В.А.², Карганова Г.Г.^{1,2}

¹ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова,
Москва

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

Флавивирусы (род *Flavivirus*, семейство *Flaviviridae*) - это оболочечные вирусы, переносимые, в основном, членистоногими и вызывающие тяжёлые заболевания по всему миру, такие как лихорадка жёлтая, Денге и Западного Нила, японский и клещевой энцефалиты и другие. Оболочка вириона флавивирусов представляет собой липидную мембрану, в которой закорены 90 белковых блоков, состоящие из 2 молекул белка оболочки E и 2 молекул мембранного белка M. Эктодомены белков E (sE) образуют внешнюю поверхность вирусной частицы, а белки M полностью скрыты под ними. Белок E отвечает за взаимодействие с иммунной системой хозяина, стабильность вириона вне клетки, проникновение вируса в клетку: связывание с рецепторами, эндоцитоз и слияние мембран вириона и эндосомы, доставку геномной РНК в цитоплазму.

Мы провели моделирование молекулярной динамики (МД) белков E и M. Анализ результатов моделирования МД димеров sE вируса клещевого энцефалита в сочетании с данными вирусологических экспериментов позволил нам сделать выводы о том, как точечные замены в молекуле белка E могут изменять характер сорбции вирионов на рецепторах и оказывать влияние на термостабильность вирионов [1, 2]. Микросекундное моделирование МД гетеротетрамерных комплексов E и M, закоренных в мембране, с разной степенью протонирования, выявило некоторые специфические черты движения молекул белков и взаимодействия их с мембраной [3]. Ранее нами были предложены низкомолекулярные ингибиторы репродукции переносимых клещами флавивирусов [4]. Более детальное моделирование МД комплексов димеров sE с этими соединениями позволило предложить биологически активные конформации ингибиторов для дальнейшего виртуального скрининга лигандов [5].

Несмотря на сложность и миниатюрность объекта, мы стремимся найти экспериментальные подтверждения теоретических находок.

Литература

- [1] L.I. Kozlovskaya et al., 2010. *Virology* 398(2):262-272.
- [2] Л.И. Козловская и др., 2013. *Медицинская вирусология* 27(2):42-53.
- [3] D.I. Osolodkin et al., 2012. *BBRC* 425:207-211.
- [4] D.I. Osolodkin et al., 2013. *ACS Med Chem Lett* 4:869-874.
- [5] E.V. Dueva et al., 2014. *Mol Inf* 33(10):695-708.

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОПИСАНИЕ И ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ НОВЫХ ШТАММОВ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

Козяева В.В., Дзюба М.В.

Центр "Биоинженерия" РАН, Москва
Электронный адрес: vkoziaeva@mail.ru

Магнитотактические бактерии (МТБ) - разнообразная по морфологии, физиологии и филогении группа микроорганизмов, способная к ориентации вдоль линий магнитного поля Земли, обусловленной наличием магнетосом - внутриклеточных кристаллов магнетита или грейгита, окруженных липопротеиновой мембраной. Являясь магнитными наночастицами биологического происхождения, магнетосомы, в отличие от химически синтезированных наночастиц, обладают рядом уникальных свойств. К таким свойствам относятся: постоянная форма и размер кристалла, зависящие от вида бактерий, высокий уровень химической чистоты кристалла, стабильный магнитный момент при стандартных условиях, а также биосовместимая поверхность и низкая токсичность. Для магнетосом предложено множество применений в медицине: в качестве носителя для направленной доставки лекарств, контрастирующих агентов в МРТ и др. Несмотря на высокий биотехнологический потенциал, природное разнообразие МТБ, особенности физиологии, а также организация геномов остаются недостаточно изученными. В связи с этим целью настоящей работы является выделение новых штаммов МТБ из природных мест обитания, определение их таксономического положения, а также характеристика особенностей их биохимии, физиологии и организации геномов.

В ходе работы из донных осадков р. Москва был выделен новый штамм магнитотактических бактерий - ВВ-1. На основании уровня ДНК-ДНК гибридизации (менее 50%), уровня сходства последовательности гена 16S с наиболее близким описанным видом *Magnetospirillum gryphiswaldense* (97,0%), а также совокупности фенотипических признаков новый штамм отнесли к новому виду рода *Magnetospirillum*. Виду было присвоено название *Magnetospirillum moscoviense* - mos.co.vi.en'se (L. adj. от р. Москва, назван по месту, откуда был выделен).

С помощью ПЦР-анализа у штамма ВВ-1 были выявлены некоторые гены, ответственные за биоминерализацию магнетосом (*nam A/B/M/K/O/P/Q/T*). Как правило, у МТБ эти гены объединяются в так называемый магнетосомный геномный остров (magnetosome genome island MAI). На филогенетическом древе, построенном на основе сравнения объединенных аминокислотных последовательностей белков NamABKMOPQT, ВВ-1 входит в единый кластер с *M.gryphiswaldense* (уровень сходства 98,9%). Также для изучаемой бактерии был секвенирован геном. Несмотря на то, что нами ранее с помощью ПЦР были обнаружены гены *nam*, в геноме последовательности этих генов обнаружены не были. Присутствовали всего четыре гена, схожие по последовательности с *namK/M/O/B*. Ранее в литературе были описаны случаи крупных хромосомных делеций у представителей рода *Magnetospirillum*, в результате которых происходила полная или частичная потеря MAI и, соответственно, утрата магнитного фенотипа. Было показано, что магнетосомный геномный остров у магнетоспирилл является генетически нестабильным благодаря наличию большого количества IS-повторов, при этом частота делеций возрастает под воздействием физиологического стресса, а также при длительном культивировании в лабораторных условиях. Предположительно, у обнаруженного нами вида появление делеционных по MAI мутантов определяется сходными причинами. В дальнейшем мы планируем продолжить работу по анализу MAI и остального генома ВВ-1 дикого типа.

БЕЛОК PIWIL2 КАК МАРКЕР ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ГЕРМИНОГЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧКА

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

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

Белки семейства PIWI, активные участники транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, играют важную роль во множестве клеточных процессов, начиная от защиты генома от активности транспозонов во время сперматогенеза и поддержания стволовых клеток до соматической регуляции и стабилизации эпигенетического состояния. Экспрессия некоторых белков этого семейства наблюдается в опухолевых тканях, в частности, PIWIL2 может выступать как биомаркер неоплазии при различных типах рака. Ранее было показано наличие в разных опухолевых тканях как полноразмерного белка PIWIL2, так и его коротких изоформ. Нами впервые выявлена экспрессия коротких изоформ 60 кДа (PL2L60) и 80 кДа (PL2L80) в различных опухолях человека и клеточных линиях, охарактеризованы соответствующие мРНК и промоторные области.

Из всех первичных опухолей яичка 95% являются опухолями герминальных клеток (testicular germ cell tumor, TGCT), представленные в 50% случаев семиномами (недифференцированные клетки, похожие на примитивные герминальные клетки), а также несеминомами (40%), в том числе злокачественными тератомами, и опухолями со смешанной гистологией (10%). Мы продемонстрировали, что в TGCT PIWIL2 экспрессируется в виде своей короткой изоформы PL2L60, при этом экспрессия PL2L60 значительно повышена в недифференцированных семиномах и существенно снижается в смешанных и несеминозных герминогенных опухолях. Эта закономерность выявлена как для образцов опухолей яичка с разной степенью дифференцировки, так и в модельной системе - на клеточной культуре NT2/D1 в процессе дифференцировки под воздействием ретиноевой кислоты. Уровень экспрессии короткой изоформы белка PIWIL2 может служить маркером, отличающим недифференцированные опухоли яичка, поддающиеся химиотерапии цисплатином, от злокачественных дифференцированных тератом с неблагоприятным прогнозом.

Работа поддержана Программой Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и грантом РФФИ № 14-04-32314_мол_а.

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПЕПТИДА Pro-Gly-Pro НА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ЭКЗАЙТОТОКСИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙРОНОВ

Львов А.М.¹, Шарипов Р.Р.^{2,3}

¹ Институт молекулярной генетики РАН, Москва

² НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва

³ Научный центр здоровья детей, Москва

Электронный адрес: delinor.mail.ru@mail.ru

Пептид Pro-Gly-Pro (PGP) и некоторые другие представители группы регуляторных пептидов, получившие название глипролины, проявляют ярко выраженные фармакологические эффекты, включая нейропротекцию. Цель данной работы - исследовать влияние ряда новых глипролинов, конъюгатов PGP с докозагексаеновой кислотой (DHA), анандамидом (AnA) и дофамином (DA) на нарушения кальциевого гомеостаза и функции митохондрий, вызванные нейротоксическим действием глутамата (Glu). Эксперименты проводили на первичных культурах зернистых клеток мозжечка крысы с использованием микрофлуориметрического анализа внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) и мембранного потенциала митохондрий в индивидуальных нейронах. Эффективность действия всех производных PGP исследовали в диапазоне концентраций 2,5-20 мкМ. Инкубация нейронов в присутствии конъюгата PGP с AnA приводила к практически полному предотвращению вызываемой Glu отсроченной кальциевой дисрегуляции (ОКД) и синхронной с ней сильной деполаризации митохондрий. Близкое по структуре соединение, конъюгат PGP с DHA, в низких концентрациях также повышало устойчивость нейронов к повреждающему действию Glu, однако в концентрации 20 мкМ оно проявляло выраженное цитотоксическое действие. Эффективность нейропротекторного действия препаратов убывала в ряду производных PGP, содержащих остатки AnA, DA и DHA, соответственно. Интересно, что производное PGP, содержащее одновременно остатки DHA и DA, оказалось неактивным, или даже слегка усиливало токсическое действие Glu на нейроны. Исследуемые соединения не влияли на синхронность изменений $[Ca^{2+}]_i$ и мембранного потенциала митохондрий в тех нейронах, в которых происходила ОКД. Проведенный нами анализ влияния ионов Mn^{2+} на амплитуды первоначальных подъемов $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на внесение Glu, и скоростей тушения флуоресценции Fura-2 (индикатора Ca^{2+}) показал, что нейропротекторные эффекты исследуемых соединений не связаны с ингибированием Glu-управляемых Ca^{2+} каналов.

Выражаем благодарность проф. В.Г. Пинелису, проф. В.В. Безуглову и д.б.н. А.М. Сурину за помощь в планировании и проведении экспериментов. Особая признательность к.х.н. Н.М. Грецкой за синтез производных PGP.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проекты № 13-04-40083-Н, № 13-04-40085-Н, № 14-04-90450) и Программы Президиума РАН "Фундаментальные науки - медицине".

ТОКСИН-ПОДОБНЫЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА LY-6/uPAR: ОТ МОДУЛЯЦИИ РЕЦЕПТОРОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ДО ПАРАКРИННОЙ/АУТОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ

Люкманова Е.Н.

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

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR) является лигандозависимым ионным каналом, который широко представлен как в центральной и периферической нервной системе, так и во многих других тканях человека, включая клетки эпителия и иммунной системы. С дисфункциями этого рецептора связано возникновение и развитие ряда заболеваний нервной, мышечной, иммунной и эндокринной систем человека. Наиболее изученными лигандами nAChR являются α -нейротоксины ядов змей. Эти небольшие белки (60-80 а.о.) имеют "трехпетельную" β -структурную организацию, и стабилизированы системой 4-5 консервативных дисульфидных связей. Большинство из этих токсинов необратимо блокируют активацию nAChR. За последнее десятилетие было открыто два типа эндогенных нейропептидов, взаимодействующих с nAChR, Lypx и SLURP. Эти нейропептиды принадлежат семейству Ly-6/uPAR и, несмотря на сравнительно невысокую гомологию первичной структуры с α -нейротоксинами змей (20-35%), вероятно, имеют схожую "трехпетельную" пространственную организацию.

Регуляторный пептид Lypx1 был впервые обнаружен в центральной нервной системе мышей. В отличие от секретируемых ?-нейротоксинов, Lypx1 закреплен в клеточной мембране, окружающей рецептор, с помощью C-концевого фосфатидилинозитольного (GPI) якоря. Lypx1 в присутствии агонистов (ацетилхолина, никотина) способен усиливать или ослаблять ток ионов через канал nAChR, играя роль аллостерического модулятора.

В отличие от Lypx1 нейропептиды SLURP-1 и SLURP-2 являются секретируемыми и не имеют последовательности для прикрепления GPI-якоря. Вероятно, SLURP-1 и SLURP-2 действуют как паракринные/аутокринные регуляторы, контролирующие рост, распространение, дифференцировку и запрограммированную гибель клеток эпителия, а также развитие воспалений и опухолей. Предполагается, что основной мишенью этих белков являются nAChR, представленные на поверхности эпителиальных клеток.

В докладе представлены результаты структурно-функциональных исследований нейропептидов Lypx и SLURP человека, выявляющие схожесть и отличия их свойств от трехпетельных α -нейротоксинов змей.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ И СКОРОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЙ МУТАНТНЫХ ФОРМ АПОМИОГЛОБИНА С ЗАМЕНАМИ АМИНОКИСЛОТ НА ПОВЕРХНОСТИ БЕЛКА

Мажорина М.А., Мельник Б.С.

Институт белка РАН, Пущино
Электронный адрес: mdudochka@mail.ru

Апомиоглобин - это небольшой, хорошо изученный белок, который часто используют как модельный объект для изучения процессов сворачивания/разворачивания глобулярных белков. Процесс сворачивания апомиоглобина проходит через образование промежуточного состояния типа расплавленной глобулы. Целью данной работы было понять, как замены гидрофобных аминокислот на поверхности апомиоглобина и введение цистеиновой связи могут повлиять на энергетический ландшафт этого белка. Ранее в нашем Институте было исследовано влияние на энергетический ландшафт апомиоглобина гидрофобных аминокислотных остатков, погруженных в ядро белка. Однако не исследованным до сих пор оставалось влияние аминокислотных остатков, расположенных на поверхности апомиоглобина. Мы выбрали три гидрофобные аминокислоты на поверхности апомиоглобина и заменили их на гидрофильные: A19S, V21T, A15S. Также на поверхности была выбрана пара близких аминокислот H36 и F106, при замене которых на цистеины может образоваться цистеиновый мостик. Для всех четырех мутантных форм апомиоглобина выполнены равновесные и кинетические эксперименты методами флуоресценции и кругового дихроизма. На основании равновесных экспериментов можно сделать вывод о стабилизации белков. На основе кинетических экспериментов рассчитаны константы скоростей сворачивания/разворачивания всех белков, построены шевронные графики. Эти графики, в свою очередь, позволили построить энергетические схемы (рассчитать свободные энергии всех состояний белков) четырех мутантных форм белков. Сравнивая эти схемы с энергетической схемой для белка дикого типа, можно сделать вывод о том, что цистеиновый мостик стабилизировал в основном состоянии расплавленной глобулы, а одиночные замены гидрофобных аминокислот на поверхности белка стабилизировали нативное состояние апомиоглобина.

Данная работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология", фонда РФФИ (№ 13-04-00923). Генно-инженерные работы выполнены при поддержке гранта РНФ № 14-24-00157.

СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА БАКТЕРИЕЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Sp245 И ИХ ВЫДЕЛЕНИЕ

Мамченкова П.В., Тугарова А.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
Саратов

Электронный адрес: norgeaddress@gmail.com

Способность к синтезу наночастиц различных элементов широко распространена среди микроорганизмов и используется биотехнологами в рамках нового научного направления в химии, называемого "green chemistry" ("зеленая" химия). Данное направление минимизирует использование агрессивных химических веществ в процессе синтеза различных материалов и, соответственно, наносимый вред окружающей среде, а также снижает затраты на производство.

Многие микроорганизмы способны к восстановлению токсичных растворимых оксоанионов Se (селената SeO_4^{2-} , селенита SeO_3^{2-}) до нерастворимого и, следовательно, менее токсичного элементарного селена. В данный процесс могут быть вовлечены как ферменты (например, нитратредуктаза), так и низкомолекулярные соединения, содержащие тиоловые группы (например, глутатион). Некоторые микроорганизмы при восстановлении оксоанионов Se способны синтезировать Se-наночастицы (Se-НЧ). Так, описано восстановление SeO_3^{2-} бактерией *Azospirillum brasilense* в процессе роста с образованием Se-НЧ, локализованных в основном внутри клеток [1].

Целью данного исследования являлся подбор оптимальных условий для синтеза однородных по размеру Se-НЧ и их выделение. В работе был использован штамм *A. brasilense* Sp245. Бактериальные клетки были выращены до поздней логарифмической фазы роста, отмыты от компонентов среды и суспензированы в физиологическом растворе. Клетки инкубировали с Na_2SeO_3 (10-50 мМ) в течение 24 часов. В этом случае анализ с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показал наличие только экстраклеточных Se-НЧ. Размер синтезированных частиц зависел от концентрации Na_2SeO_3 в среде: при 10 мМ синтезировались наиболее крупные частицы - диаметром до 65 нм. Размеры и количество Se-НЧ достигали максимума на 4 ч инкубации. Далее было проведено выделение Se-НЧ, включавшее удаление клеток центрифугированием, фильтрацию надосадка через фильтр (0.45 мкм) и дальнейшую концентрацию полученных Se-НЧ центрифугированием. ПЭМ показала наличие Se-НЧ без клеток.

Таким образом, нами подобраны условия для экстраклеточного синтеза Se-НЧ определенного размера штаммом *A. brasilense* Sp245 и предложена методика их выделения и очистки.

Литература

- 1 Tugarova A.V., Vetchinkina E.P., Loshchinina E.A., Burov A.M., Nikitina V.E., Kamnev A.A. Reduction of selenite by *Azospirillum brasilense* with the formation of selenium nanoparticles. *Microb. Ecol.* 2014. V. 68, N 3. P. 495-503. (DOI: 10.1007/s00248-014-0429-y).

БИОМЕДИЦИНСКИЕ КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ: ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Матлашов М.Е., Щеглов А.С., Наделяева И.И.

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

ГНЦ РФ Федеральный медицинский биофизический центр
им. А.И. Бурназяна

Электронный адрес: jukart@mail.ru

Разработка биомедицинских клеточных технологий является быстро и успешно развивающейся областью современной науки. В настоящее время продукты клеточной и тканевой инженерии успешно применяются для регенерации костной и соединительной ткани, кожи, лечения ран. Общий объем рынка таких продуктов оценивается в 1.3 млрд долл. (данные за 2013 год). При этом значительное количество продуктов и технологий находится на стадии клинических испытаний, что позволяет прогнозировать дальнейший рост объемов рынка. Так, в стадии клинических испытаний находятся клеточные препараты для лечения ряда сердечно-сосудистых, воспалительных и онкологических заболеваний, болезней органов зрения, нервной, выделительной и дыхательной систем. Перспективными направлениями развития данной области являются использование аутологичных клеток, технологии управления дифференцировкой и дедифференцировкой клеток. Наиболее амбициозной задачей исследований является разработка биоинженерных органов, пригодных для трансплантации. Несмотря на значительный прогресс в этом направлении, ряд ключевых проблем данной технологии до сих пор не решен. Уровень исследований и разработок ведущих российских ученых в области биомедицинских клеточных технологий соответствует мировому, однако данные технологии в России практически не применяются. Основным барьером для использования существующих и развития отечественных биомедицинских клеточных технологий является полное отсутствие правового регулирования этой области.

РОЛЬ ИОНОВ ЩЕЛОЧНЫХ МЕТАЛЛОВ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ УРИДИНФОСФОРИЛАЗЫ

Мордкович Н.Н.¹, Окорокова Н.А.¹, Сафонова Т.Н.¹, Поляков К.М.², Вейко В.П.¹

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Электронный адрес: serkovan@mail.ru

Уридинфосфоорилаза (UDP КФ 2.4.2.3) - фермент катаболизма нуклеозидов, осуществляющий обратимый фосфорилиз уридина до урацила и рибозо-1-фосфата. Ранее нами был клонирован ген *udp* из *Shewanella oneidensis* MR-1 (SUDP), проведена его гетерологичная экспрессия и очищен рекомбинантный белок, определены основные характеристики, получен кристалл и проведен PCA. На основе данных PCA для SUDP отмечено, что отдельные петлевые участки полипептида (88-93 и 212-219 а.о.) имеют ярко выраженную флуктуационную подвижность, занимая в различных субъединицах отличающееся относительно белковой глобулы положение. Также было установлено, что остаток Cys212 располагается в непосредственной близости от фосфат-связывающей области фермента и входит в состав участка 212-219 а.о. Для определения роли остатка цистеина в положении 212 в функционировании SUDP была получена мутантная форма, содержащая синонимическую замену C212S. В ходе сравнительного изучения свойств мутантной (C121S) и исходной форм фермента было выявлено, что, при сохранении вторичной, третичной и четвертичной структур исследуемых белков, значение константы Михаэлиса (K_m) по фосфат-иону для мутантной формы было значительно выше, по сравнению с SUDP. При этом значения K_m для уридина у обеих форм фермента оставались неизменными. Анализ данных, полученных в результате проведения PCA мутантной формы C212S, выявил разупорядочение остатка Arg88 - одного из остатков, формирующих связь с фосфат-ионом в активном центре фермента. Ранее в литературе было показано влияние иона K^+ на активность UDP и с помощью PCA локализовано положение этого иона в составе молекулы UDP из *E.coli*. Экспериментально нами было изучено влияние ионов в ряду Li-Na-K-Rb-Cs и показано их влияние на активность изучаемых уридинфосфоорилаз. Объяснена роль этих ионов в формировании и поддержании активной формы UDPаз, заключающаяся в образовании более "плотного" контакта субъединиц в гомодимере через попарное комплексообразование с остатками Glu49, Ile69 и Ser73 из двух различных субъединиц и приводящая к стабилизации структуры петлевых элементов фермента (88-93 и 212-219 а.о.) в наиболее выгодных для связывания иона неорганического фосфата конформациях.

СПЕКТРОСКОПИЯ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ ЦИТОХРОМА C ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ ИНТАКТНЫХ МИТОХОНДРИЙ

Никельшпарг Э.И.

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

Электронный адрес: evelinanick@gmail.com

Изменение редокс-состояния цитохрома с дыхательной цепи (ЭТЦ) митохондрий постоянно происходит при нормальном функционировании ЭТЦ. Нарушение переноса электронов цитохромами лежит в основе многих патологических процессов в митохондриях, таких как сверхпродукция активных форм кислорода и инициация апоптоза. Современные методы исследования митохондрий не дают представления о редокс-состоянии отдельных компонентов при работающей дыхательной цепи. Нашей группой впервые было показано, что спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР, англ. SERS) дает возможность избирательно исследовать конформацию и редокс-состояние межмембранного переносчика электронов - цитохрома с в интактных функционирующих митохондриях при низких концентрациях образца. Этот эффект связан с многократным усилением КР цитохрома с при помещении митохондрий на плазмонные наноструктуры серебра. Целью представленной работы являлась разработка методики получения усиления КР от цитохрома с в интактных функционирующих митохондриях и выявление факторов, влияющих на интенсивность сигнала ГКР.

Для регистрации спектров ГКР суспензию интактных митохондрий, выделенных из мышц бедра крысы, помещали на композитные наноструктуры из оксида кремния и серебра (SiO_2 -Ag). В работе использовали КР-микроспектрометр In Via Raman с лазером 532 нм и объективом x5, NA 0,15. Мы показали, что (1) спектры ГКР интактных митохондрий соответствуют спектрам гемопорфирина с-типа; (2) в отсутствие субстратов цикла Кребса спектры ГКР митохондрий содержат пики окисленного цитохрома с; внесение пирувата, сукцината и АДФ приводит к появлению пиков ГКР восстановленного цитохрома с; (3) в используемых условиях эксперимента митохондрии обладают функциональной активностью, что было доказано методом полярографии, при этом уровень их активности соответствует литературным данным; (4) интенсивность сигнала ГКР цитохрома митохондрий, а также общий вид спектра не зависят от электростатических взаимодействий в системе наночастицы SiO_2 -Ag - митохондрии; (5) внесение валиномицина, уменьшающего межмембранное пространство митохондрий, приводит к появлению пиков цитохромов b-типа внутренней мембраны митохондрий, что свидетельствует о зависимости интенсивности спектра ГКР от расстояния между наноструктурами и исследуемым веществом.

Полученные данные свидетельствуют о чувствительности спектроскопии ГКР к изменениям редокс-состояния цитохрома с в интактных митохондриях при модуляции активности электронного транспорта в ЭТЦ и изменении трансмембранного градиента ионов H^+ .

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ КОМПЛЕКСА ЯЩЕРИЦ
DAREVSKIA RADDEI НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ
МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА**

Осипов Ф.А.^{1,2}, Гирнык А.Е.¹, Вергун А.А.^{1,2}, Омельченко А.В.³

¹ Институт биологии гена РАН, Москва

² Московский педагогический государственный университет, Москва

³ Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва
Электронный адрес: osipov_feodor@mail.ru

Исследование процессов происхождения видов является важной биологической задачей. Особенно актуальным представляется изучение эволюционных механизмов на ранних стадиях видообразования, т.к. они в наибольшей степени раскрывают роль и влияние генетических, популяционных и экологических факторов в филогении видов. В связи с этим кавказские скальные ящерицы рода *Darevskia* являются уникальным модельным объектом для изучения этих процессов: они представляют собой эволюционно связанный, локально расположенный комплекс двуполых и однополых видов, обитающих в чрезвычайно разнообразных природных условиях. В данной работе проводилась оценка видового/подвидового статуса двух таксонов комплекса *Darevskia raddei* - *D. raddei raddei* и *D. raddei nairensis* на основании геномного маркирования особей из 13 популяций по 3 микросателлитным локусам (40 аллельных вариантов). В качестве контроля для сравнения привлекались особи вида *D. valentini* из 4 популяций, маркированные по тем же локусам с таким же количеством аллелей. Мерой сравнения выступали генетические расстояния по Нею - Да. По результатам дисперсионного анализа показано, что различия расстояний по Нею между популяциями заведомо одного вида ящериц ($D_a = 0,259$), между популяциями таксонов *raddei-nairensis* ($D_a = 0,632$) и между популяциями, принадлежащими к заведомо различным видам ($D_a = 0,849$), статистически значимы: $F(2; 48) = 133,7$ ($p = 0,00000$).

Таким образом, генетические расстояния между популяциями таксонов *D. raddei raddei* и *D. raddei nairensis* меньше, чем между популяциями различных видов, но значимо больше, чем между популяциями одного вида. Это, с нашей точки зрения, свидетельствует о том, что вид *D. raddei* находится в настоящий момент в процессе дивергенции и разделяется на два различных вида.

Исследование поддержано грантом Президента РФ № МК-2349.2014.4.

**АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ КАК ФАКТОРЫ ВРОЖДЕННОГО
ИММУНИТЕТА**

Пантелеев П.В., Болосов И.А., Баландин С.В., Овчинникова Т.В.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: alarm14@gmail.com

В ходе исследований механизмов, лежащих в основе защитных реакций организма-хозяина, был открыт целый ряд природных защитных молекул, продуцируемых позвоночными и беспозвоночными животными, растениями, грибами и бактериями. К ним относятся паттерн-распознающие, в том числе Toll-подобные рецепторы, скавенджер-рецепторы, пептидогликан-распознающие белки, лектины, пентраксины, компоненты системы комплемента, липополисахарид-связывающий белок, лизоцим, лактоферрин, цитокины, хемокины и многие другие молекулярные факторы, регулирующие инициацию и течение защитных реакций. Ключевую роль в отражении атаки патогенов иммунной системой хозяина играют антимикробные пептиды (АМП). Изначально АМП, выделенные из гемолимфы насекомых, кожных секретов амфибий и фагоцитов млекопитающих, обратили на себя внимание благодаря способности подавлять рост различных микроорганизмов. По мере обнаружения все новых и новых АМП стало очевидным, что они являются эволюционно древними универсальными компонентами системы врожденного иммунитета. Наряду с фактами, свидетельствующими о прямом эффекторном (антибиотическом) действии, была обнаружена способность многих АМП проявлять регуляторную (иммуномодулирующую) функцию и участвовать не только в функционировании врожденного, но и в регуляции приобретенного иммунитета. В связи с этим в литературе сосуществуют два термина: "антимикробные пептиды" ("antimicrobial peptides") и "защитные пептиды" ("host defense peptides"), последний из которых чаще применяют в отношении пептидов, координирующих работу иммунных и регенеративных процессов организма-хозяина.

На фоне снижения эффективности традиционной антибиотикотерапии, которое связано, в первую очередь, со стремительным ростом числа резистентных возбудителей инфекционных заболеваний, АМП в последние годы привлекают всё больше внимания в качестве возможных прототипов антимикробных препаратов и иммуномодуляторов нового поколения. На сегодняшний день около десяти препаратов на основе АМП, представляющих различные структурные классы и природные источники, проходят предклинические и различные стадии клинических испытаний.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (№ МК-6023.2014.4).

ФОРМИРОВАНИЕ ГЕННЫХ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ ДНК-ПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ С ВКЛЮЧЕНИЕМ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Поликов В., Ревезук З., Бакулев В., Назарова О., Некрасова Т., Золотова Ю., Панарин Е., Касьяненко Н.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
Электронный адрес: vetal.benzin@mail.ru

ДНК-поликатсионные комплексы широко используются для изготовления генных векторов. Образование подобных комплексов вызвано взаимодействием отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК с положительно заряженными группами полимера в растворе. Компенсация заряда ДНК позволяет перейти ДНК из клубка в наноразмерные конденсированные частицы, что позволит генному вектору проникнуть через клеточную мембрану. Внедрение различных включений в генный вектор позволяет расширить спектр использования таких систем в медицине. Например, включение соответствующих молекул может дать возможность дополнительного использования фотодинамической терапии, а включение наночастиц металла позволяет многократно усиливать такой эффект. Модификация генных векторов молекулами флюорофора позволяет также более подробно изучить механизм трансфекции. Известно, что усиление квантового выхода флюоресценции можно добиться путем локализации молекул флюорофора вблизи поверхности металла. Для создания таких комплексов мы использовали полученный Т.Н. Некрасовой и О.В. Назаровой в Институте высокомолекулярных соединений РАН синтетический полимер полидиметиламиноэтилметриллат (pDMAEM) с синтезированными на нем наночастицами серебра. Наличие серебра на полимере подтверждается присутствием пика плазмонного резонанса в спектре оптической плотности полимера при длине волны 400 нм и изображениями, полученными методами атомной силовой и сканирующей электронной микроскопии. Метод АСМ показывает, что наночастицы серебра закреплены на полимерной цепи, что позволяет им находиться непосредственно в составе комплекса. С помощью АСМ и метода гель-электрофореза было показано, что конденсация ДНК наступает при соотношении ионогенных групп полимера и ДНК $N/P > 1$. При $N/P < 1$ наблюдается формирование сложных структур - частично компактизованная ДНК, на которой с помощью полимера фиксированы наночастицы.

В качестве флюоресцирующего агента использовался краситель DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Принято считать, что DAPI взаимодействует с ДНК по малой бороздке, что позволяет ему находиться в локальной близости с наночастицами в составе комплекса, причем его пик флюоресценции лежит в области плазмонного резонанса наночастиц. С помощью метода флюоресцентной спектроскопии было показано, что краситель остается в активном состоянии в составе комплекса. Также наблюдался небольшой эффект усиления флюоресценции по сравнению с наблюдаемой для комплексов без наночастиц. Подобные системы изучали с помощью методов вискозиметрии, кругового дихроизма и сканирующей электронной микроскопии.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 13-03-01192А) и СПбГУ (№ 11.38.644.2013).

АУТОФАГИЧЕСКИЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА ATG8 *TRITICUM AESTIVUM*: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ

Рябовол В.В., Файзуллин Д.А., Хайрутдинов Б.И., Тарасова Н.Б., Зуев Ю.Ф., Минибаева Ф.В.

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань
Электронный адрес: vicry@yandex.ru

Аутофагия на молекулярном уровне представляет собой сложный многоэтапный процесс, реализуемый при участии большого количества разнообразных белков. Одним из ключевых аутофагических белков является убиквитин-подобный белок ATG8, активность которого является необходимым условием формирования аутофагосом. Вследствие этого его используют в качестве молекулярного маркера для мониторинга макроаутофагии. Сложная структура этого низкомолекулярного белка (~14 кДа) во многом определяет его многофункциональность. Семейство ATG8 пшеницы (*Triticum aestivum* L.) представлено, по крайней мере, девятью членами, которые подразделяются на три подсемейства: 1) *TaATG8a-f*, 2) *TaATG8g*, 3) *TaATG8h-i*. Идентичность аминокислотного состава между *TaAtg8a-f* и *TaAtg8g* составила 87-88 %, между *TaAtg8h-i* и *TaAtg8g* - 55-57%. Биоинформатический анализ показал, что все представители белков этого семейства *T. aestivum* имеют убиквитиновый домен, ATG7-связывающий и тубулин-связывающий сайты. Кроме того, на C-конце всех изоформ *TaATG8* располагается консервативный глициновый остаток, который необходим для конъюгации с липидом фосфотилэтанол-амином, основным липидом мембраны аутофагосомы.

Нами получен рекомбинантный белок *TaATG8* (изоформа g) и проанализированы особенности его пространственной организации. Результаты, полученные с помощью ИК- и ЯМР-спектроскопии, указывают на значительную долю упорядоченной вторичной структуры (41%), фолдинг и высокую структурную подвижность *TaATG8g*, что, вероятно, обуславливает его функционирование при межмолекулярном распознавании и взаимодействии с функциональными лигандами в процессе формирования аутофагосом. Компьютерная модель продемонстрировала, что исследуемый нами белок обладает классической трехмерной структурой, типичной для белков семейства ATG8. Кроме того, в структуре полипептида выявлены специфичные W- и L-сайты для взаимодействия с различными лигандами, обнаружено, что они конформационно сближены и формируют на поверхности *TaATG8g* два гидрофобных кармана. Таким образом, наши данные позволяют заключить, что *TaATG8g* обладает характеристиками, необходимыми для его вовлечения в биогенез мембран аутофагосом.

ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ [C60] ФУЛЛЕРЕНОВ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ И НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Сергеева В.А., Костюк С.В.

Медико-генетический научный центр РАМН, Москва
Электронный адрес: sergeevavasilina@gmail.com

Медицинское применение нанотехнологий привело к формированию нового междисциплинарного направления медицинской науки. Наибольшую проблему применения этих технологий представляют возможные риски при использовании синтетических наноматериалов, в частности, фуллеренов, связанные с их воздействием на клетки человека. Исследовали влияние новых водорастворимых производных фуллерена C₆₀, имеющих полярные функциональные группы (N-метилпиперазиновую, фосфоновокислотную и 3-фенилпропионильную) на пролиферативную активность фибробластов, мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и раковых клеток линии МСF7. Для оценки цитотоксичности исследуемых соединений использовали МТТ-тест (концентрации соединений 0,1 нМ - 1 мМ, 72 часа), который основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиума бромид (МТТ) до формазана, образование которого детектируется спектрофотометрически. Наиболее цитотоксичным является соединение фуллеренов с N-метилпиперазиновыми заместителями: гибель фибробластов, МСК и раковых клеток наблюдалась при концентрациях этого соединения 50 нМ и больше. Менее цитотоксичными оказались соединения фуллерена, имеющие фосфоновокислотную и 3-фенилпропионильную группы - гибель клеток наблюдалась при воздействии этих производных фуллерена в концентрациях, превышающих 1 мМ и 50 мкМ, соответственно.

При добавлении в среду культивирования клеток соединений фуллеренов в нецитотоксической концентрации наблюдали нелинейную зависимость количества метаболически активных клеток от концентрации производных фуллерена. Было показано, что при концентрации фуллеренов с 3-фенилпропионильными, фосфоновокислотными и N-метилпиперазиновыми заместителями: 10-30 мкМ, 100-150 мкМ и 4-15 нМ, соответственно, увеличивалось относительное количество метаболически активных клеток, причем наибольший эффект наблюдался для производных фуллеренов с 3-фенилпропионильными группами. С помощью метода флуоресцентной микроскопии было обнаружено, что исследуемые водорастворимые производные фуллеренов обладают слабой флуоресценцией в диапазоне длин волн 600-712 нм, что позволило детектировать соединения фуллеренов в митохондриях фибробластов и МСК.

Показано, что в диапазоне концентраций 0,01-1 нМ исследуемые производные фуллеренов вызывают увеличение пролиферативной активности клеток на 15-20%. Полученные данные согласуются с увеличением экспрессии маркеров пролиферации - белков PCNA и Ki-67, определяемой методом проточной цитофлуориметрии с использованием антител к Ki-67 и PCNA, конъюгированных с FITC. Повышение пролиферативной активности клеток обусловлено активацией клеточного цикла. Методом ПЦР в реальном времени подтвердили, что возрастает активность гена CCND1 (циклина D1), регулирующего переход клеток из фазы клеточного цикла G1 в фазу S, и не изменяется уровень экспрессии генов ингибиторов киназ - CDKN2 и CDKN1A.

ГЕНЫ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА РАСТЕНИЙ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ФИЛОГЕНИЯ, ЭВОЛЮЦИЯ

Слугина М.А., Борис К.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва
Центр "Биоинженерия" РАН, Москва
Электронный адрес: mashinmail@mail.ru

В углеводном метаболизме растений участвует не менее 40 белков. Интерес к их изучению обоснован тем, что они не только отвечают за питание и рост растений, но и принимают участие в формировании ответа на воздействие стрессовых факторов. Известны механизмы работы данных белков, но недостаточно сведений о кодирующих их генах: не описан их полиморфизм и аллельные варианты, не изучено возможное влияние мутаций на функции белков и устойчивость к абиотическим факторам.

Предметом данного исследования стали два гена метаболизма сахарозы, для которых наиболее ярко показана связь со стрессоустойчивостью: сахарозсинтаза *Sus2*, и инвертаза *Pain-1*.

Другая проблема, на решение которой направлено данное исследование, связана с необычайной сложностью и неоднозначностью таксономии одного из крупнейших семейств двудольных растений (Solanaceae) и в частности рода *Solanum*, систематика которого считается крайне проблематичной. Ранее систематика растений основывалась, главным образом, на морфологии и географическом распространении. Теперь для более точного описания филогенетических связей используются результаты анализа варибельности различных последовательностей генома, среди которых достаточно информативными являются последовательности ядерных генов.

Целью работы стала идентификация и анализ полиморфизма полноразмерных генов *Sus2* и *Pain-1* у представителей рода *Solanum*. Для этого были получены и проанализированы 15 первичных нуклеотидных последовательностей 9 видов (*S. habrochaites*, *S. peruvianum* var. *dentatum*, *S. peruvianum*, *S. cheesmanii*, *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum*, *S. glandulosum*, *S. chmlewskii*, *S. lycopersicum*) диких и культивируемых томатов.

Длина последовательностей *Sus2* варьировала от 3904 до 4031 нуклеотида. Последовательности состояли из 13 экзонов и 12 интронов, что позволило отнести их к *Sus1*-группе двудольных растений. Общий уровень варибельности составил 8%. Выявлены как единичные нуклеотидные замены (331 SNPs), так и индели, среди которых есть как видоспецифичные, так и характерные для групп видов. Экзонные последовательности были транслированы, и выявлены аминокислотные замены, среди которых были и радикальные, которые потенциально могут приводить к образованию иной конформации белка.

Впервые определены уровни экспрессии *Sus2* в максимальном количестве различных органов растения и на различных этапах бутонизации и созревания плодов. Наиболее низкий уровень экспрессии гена характерен для корней и листьев, экспрессия *Sus2* увеличивается при формировании и росте бутонов, достигая максимума в период перед началом цветения.

Дендрограмма, основанная на полиморфизме гена *Sus2*, совпала с современной классификацией *Solanum*. Предложена схема возможной эволюции данных генов-гомологов у представителей *Solanum*.

Последовательности гена *Pain-1* были более полиморфны, чем у гена *Sus2*. Также были выявлены аминокислотные замены, в том числе радикальные.

Построенная на основе нуклеотидных последовательностей гена *Pain-1* дендрограмма в целом совпадала с общепринятой классификацией *Solanum* и филогенетической роду по гену *Sus*, таким образом, оба гена могут быть использованы для филогенетического анализа и таксономической идентификации образцов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМБИНАЦИИ МЕТОДОВ КОМБИНАТОРНОЙ ХИМИИ И БИОЛОГИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Смирнов И.В., Мокрушина Ю.А., Степанова А.В., Терехов С.С., Пономаренко Н.А., Габиров А.Г.

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

Создание биокатализаторов с заранее заданными свойствами специфичности и каталитической активности является одной из интереснейших задач фундаментальной молекулярной биологии, имеющую ярко выраженную практическую направленность. Создание принципов конструирования биокатализаторов позволит вплотную подойти к проблеме получения стабильных в токе крови терапевтических препаратов с заданными параметрами каталитической функции, а также "каталитических вакцин" на основе антител. Инновационной составляющей исследования является разработка принципов создания высокорепрезентативных библиотек генов, экспрессирующих биокатализаторы и подходов к их скринингу с целью получения белков с каталитической функцией.

В качестве матриц для решения этой задачи можно использовать (i) ферменты, как эволюционно совершенные биокатализаторы с оптимальной структурой активного центра, позволяющего осуществлять сложные каталитические процессы; (ii) иммуноглобулины, как эволюционно совершенные специфические "байндеры".

Суть комбинаторных методов заключается в проведении случайных замен на уровне генов с последующим отбором мутантных вариантов, отвечающих цели улучшения свойств фермента. Однако скрининг полученных мутантов требует наличия высокоэффективной системы отбора улучшенных форм фермента.

Рациональные подходы основаны на анализе трехмерной структуры белка с выявлением перспективных замен, способных существенным образом повлиять на свойства активного центра фермента или белка в целом. Развитие инновационных методов компьютерного анализа сделало возможным моделировать молекулярные механизмы белок-лиганд.

Техника молекулярного докинга позволяет определить аминокислоты, ответственные за связывание лиганда и типы молекулярных взаимодействий, которые играют критическую роль в процессе реакции. Определенные таким образом аминокислотные остатки являются потенциальными мишенями для сайт-направленного мутагенеза. Более углубленным подходом к изучению ферментативных реакций является объединение высокоточного квантово-механического (QM) уровня описания активного центра с приблизительным описанием, например, с использованием классической молекулярной механики (MM), остальной части белка.

Используя комбинацию современных методов компьютерных расчетов и новых технологий скрининга библиотек генов ферментов и антител можно получать биокатализаторы с улучшенными кинетическими характеристиками и специфичностью. Исследования могут быть использованы для ответа на фундаментальные вопросы энзимологии об эволюции активного центра фермента, а также найти прикладное биотехнологическое и биомедицинское применение.

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 9 ТИПА, ИНДУЦИРУЕМОЙ УРОКИНАЗОЙ, В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ТНР-1

Стафеев Ю.С., Меньшиков М.Ю., Зубкова Е.С., Белоглазова И.Б., Парфенова Е.В.

Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава РФ, Москва
Электронный адрес: yuristafeev@gmail.com

Проблема воспаления и заболеваний, связанных с латентным воспалением (атеросклероз, миокардиты, онкологические заболевания), очень важна для современной медицины. Изучение механизмов сигналинга, приводящего к активации ядерного фактора-каппа В (NF-κB), является перспективным направлением для выявления новых терапевтических мишеней. Мы изучили роль фактора NF-κB в регуляции экспрессии фактора воспалительной инвазии моноцитов, матриксной металлопротеиназы 9 типа (ММП-9), индуцируемой урокиназой. Нами также было изучено влияние транскрипционных факторов, рецепторов активации пролиферации пероксисом PPARα и PPARγ, а также гистоновых деацетилаз 3 класса сиртуинов на развитие эффекта урокиназы. В работе использовалась клеточная линия моноцитов человека ТНР-1, экспрессию ММП-9 определяли методом зимографии.

В ходе работы было проведено исследование цитотоксических эффектов используемых фармакологических агентов, активирующих или ингибирующих исследуемые молекулы-мишени, методом МТТ-анализа. Это позволило определить рабочие концентрации используемых лигандов. Основываясь на полученных данных, мы проводили предобработку клеток ТНР-1 этими лигандами с последующим определением экспрессии ММП-9 методом зимографии. В ходе работы мы выяснили, что лиганды PPARγ оказывают противовоспалительное действие, а достоверные эффекты со стороны сиртуинов и PPARα выявить не удалось. Среди предполагаемых механизмов мы рассматривали регуляцию экспрессии ИКК (киназа ингибиторной субъединицы транс-фактора NF-κB - IκB) лигандами PPARγ и методом Western-блоттинга показали ингибирование экспрессии ММП-9, индуцируемой урокиназой, и базальной экспрессии ММП-9 в ответ на ингибирование ИКК.

Полученные данные свидетельствуют об ингибировании экспрессии ММП-9, индуцируемой урокиназой, активирующими лигандами PPARγ, и указывают на возможность использования их в качестве средств для предотвращения воспалительной клеточной инвазии при лечении системного воспаления.

РАЗРАБОТКА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО МЕТОДА СОЗДАНИЯ МУТАНТНЫХ ФОРМ КАТАЛИТИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА С ЗАДАННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ ПО ОТНОШЕНИЮ К ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМ ТОКСИНАМ

Степанова А.В., Смирнов И.В., Головин А.В., Пономаренко Н.А., Габитов А.Г.

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

Антитело А17 было отобрано в результате скрининга полусинтетической библиотеки переменных фрагментов генов иммуноглобулинов человека на ковалентное взаимодействие с необратимыми ингибиторами сериновых гидролаз. Поскольку данные ингибиторы по механизму действия являются аналогами фосфорорганических токсинов, нами было сделано предположение, что антитело А17 будет способно их связывать. Мы показали, что антитело А17 способно гидролизовать параоксон, и что эта реакция проходит через стадию образования ковалентного интермедиата. Однако эффективность взаимодействия А17 с параоксином составляет всего $9 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$, что недостаточно для использования его в качестве антидота. Основной фундаментальной задачей нашей работы является определение необходимых условий для улучшения реакций связывания и гидролиза фосфорорганических токсинов каталитическим антителом А17. Предлагаемый подход основан на использовании гибридного метода квантовой и молекулярной механики, что позволит понять механизм реакции и роль аминокислотных остатков биокатализатора, входящих в состав активного центра. С помощью методов компьютерного моделирования определен механизм взаимодействия антитела А17 с параоксином. Мы установили, что для первичного нековалентного связывания и правильной ориентации параоксона внутри активного центра предпочтительнее положительно заряженные аминокислоты, но для гидролиза необходимы отрицательно заряженные аминокислоты (для стабилизации гидроксил-иона). Мы показали, что замена серина в 35 положении легкой цепи на аргинин привела к увеличению скорости взаимодействия антитела с параоксином на два порядка по сравнению с диким типом. Однако этот мутант не обладал способностью гидролизовать параоксон. Замена серина на гистидин привела к улучшению ковалентного связывания параоксона, однако скорость гидролиза не изменилась. Мутант с глутаминовой кислотой в 35 положении не обладал активностью по отношению к параоксону.

НК-КЛЕТКИ С ФЕНОТИПОМ $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{HLA-DR}^+\text{CD16}^+\text{CD57}^-$ ОБЛАДАЮТ ВЫСОКОЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ СПОСОБНОСТЬЮ

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

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

Наличие у НК-клеток различных наборов поверхностных маркеров может сопровождаться различиями в пролиферативной способности клеток. Данная работа посвящена определению фенотипических маркеров, необходимых для выбора НК-клеток человека с целью получения долгоживущих клонов. НК-клетки выделяли магнитной сепарацией или с помощью клеточной сортировки из мононуклеаров периферической крови здоровых доноров. Клоны НК-клеток получали путем клеточной сортировки или лимитирующих разведений исходной клеточной суспензии с последующим культивированием в присутствии ИЛ-2 (100 ед./мл) с добавлением фидерных клеток К562, несущих на своей поверхности мембраносвязанный ИЛ-21. Поверхностную экспрессию маркеров CD56, CD16, CD25, CD57, CD8, CD107a, HLA-DR, NKG2C, KIR2DL2/DL3 на поверхности клонированных клеток анализировали методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентно меченых антител. Были проанализированы НК-клоны, полученные от 6 доноров из различных субпопуляций, в том числе $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{HLA-DR}^+$, $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{HLA-DR}^-$, CD56^{dim} , CD57^+ . Частота получения клонов $\text{CD56}^{\text{bright}}$ была выше, чем у клонов CD56^{dim} . При культивировании клеток с фенотипом CD56^{dim} выросшие клоны имели преимущественно фенотип $\text{CD56}^{\text{bright}}$, так как при активации клеток уровень экспрессии CD56 увеличивается. Частота получения клонов HLA-DR^+ не отличалась от частоты получения клонов HLA-DR^- . Однако, в процессе выращивания клеток с фенотипом HLA-DR^- наблюдалось появление экспрессии HLA-DR. Таким образом, экспрессия HLA-DR не является маркером отдельной субпопуляции НК-клеток, а индуцируется в процессе активации. НК-Клоны $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{HLA-DR}^+$ обладали лучшим ростом по сравнению с $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{HLA-DR}^-$ -клонами, что свидетельствует об их более высокой пролиферативной способности. Длительное культивирование НК-клеток приводило к увеличению уровня экспрессии CD16. Рост экспрессии HLA-DR сопровождался ростом экспрессии CD16. Частота получения клонов в субпопуляции $\text{CD57}^{\text{bright}}$ была наименьшая, при этом НК-клоны $\text{CD57}^{\text{bright}}$ обладали наихудшим клеточным ростом. Таким образом, можно заключить, что при культивировании клоны с фенотипом $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{HLA-DR}^+\text{CD16}^+\text{CD57}^-$ обладают лучшей пролиферативной способностью. Получение НК-клеток с таким фенотипом может быть полезным для наращивания НК-клеток для иммунной терапии.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 14-04-01842).

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В МИКРОКАПСУЛАХ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Сумина А.М.¹, Акасов Р.А.¹, Буров С.В.², Шевало И.³, Марк А.³, Марквичева Е.А.¹

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

² Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

³ Национальный политехнический институт Лотарингии, UPR CNRS 3349, Нанси, Франция

Электронный адрес: sumina.anastasia@mail.ru

Восстановление связей и сухожилий является одной из наиболее актуальных задач тканевой инженерии, для решения которой используют сочетание хирургических и биоинженерных методов, включающих имплантацию биоразлагаемых матриц с иммобилизованными на/в них клетками пациента. Получение биомассы клеток пациента при этом может происходить как в монослойной культуре (2D), так и в 3D системах, например, на микрочастицах или в микрокапсулах (МК). Использование микрокапсул имеет ряд преимуществ перед остальными подходами. В частности, внутри МК создается состояние гипоксии, которая положительно сказывается на выживаемости клеток при их трансплантации в организм пациента. В микрокапсулы также можно загрузить ростовые факторы или биоактивные вещества, присутствующие в соединительной ткани (например, гиалуроновую кислоту).

Целью работы являлась разработка способа культивирования мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученных из жировой ткани человека, в полиэлектролитных альгинат-хитозановых микрокапсулах для наращивания биомассы клеток, а также для изучения взаимодействия мезенхимальных и других типов клеток при их совместном культивировании. МСК были инкапсулированы с помощью электростатического генератора микрочастиц методом, разработанным нами ранее [1], а рост клеток изучали в течение 2-3 недель. МСК внутри МК не формировали клеточные агрегаты. В то же время было обнаружено, что МСК самопроизвольно агрегируют под действием пептида, содержащего RGD(Arg-Gly-Asp), последовательность, с образованием мультиклеточных сфероидов с диаметром 200-300 мкм. Минимальная концентрация пептида для образования сфероидов составляла 10 мкМ, при этом увеличение концентрации до 50 мкМ не оказывало цитотоксического эффекта на клетки. Также было показано, что способность МСК к самопроизвольному агрегированию снижалась по мере роста числа пассажей. Полученные с помощью RGD- пептида мультиклеточные сфероиды было предложено капсулировать с целью их длительного культивирования *in vitro* в 3D культуре и получения биомассы клеток.

Литература

1. Zaytseva-Zotova D. et al., Polyelectrolyte microcapsules with entrapped multicellular tumor spheroids as a novel tool to study the effects of photodynamic therapy, J. Biomed Mater Res., 2011, 97B (2) : 255-262.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НАТИВНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ *NIVEISPIRILLUM IRAKENSE*

Суркина А.К., Гринёв В.С.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

Электронный адрес: surkina-ak@mail.ru

В настоящее время актуальны поиск и изучение бактериальных гликополимеров, не токсичных для человека и животных и проявляющих характерные для классических эндотоксинов биологические свойства. До конца не изучен вопрос о взаимосвязи между токсичностью, оказываемыми эффектами на клетки иммунной системы макроорганизма и молекулярным строением полисахаридсодержащих полимеров. Перспективными в этом плане являются непатогенные для человека азотфиксирующие ризобактерии *Niveispirillum irakense* КВС1 (ЛПС_{КВС1}) и КА3 (ЛПС_{КА3}), чьи липополисахариды (ЛПС) близки по химическому составу, однако отличаются по биологическим свойствам. С целью установления связи между структурой и биологической активностью ЛПС подвергались дефосфорилированию и О-дезацелированию.

В экспериментах на белых беспородных мышьях определены LD₅₀, которые составили 4.6 и 5.5 мкг/мышь для ЛПС_{КВС1} и ЛПС_{КА3}, соответственно, что значительно (около 30 раз) превышало LD₅₀ ЛПС *Escherichia coli* O55:B5 (ЛПС_{E.coli}). Дефосфорилирование и деацелирование исследуемых препаратов приводило к снижению острой токсичности в 10 и 30 раз, соответственно. Показана слабая индукция фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α) клеткам цельной крови человека под воздействием ЛПС азоспирилл, однако стимулирующий эффект ЛПС_{КА3} был в 2 раза выше, по сравнению с ЛПС_{КВС1}. Дефосфорилирование препаратов приводило к полной утрате цитокининдуцирующих свойств, в то время как деацелирование значительно увеличивало биологическую активность образцов. При изучении антагонистических свойств исследуемых препаратов показано, что только дефосфорилированный ЛПС_{КА3} полностью подавлял вызванный ЛПС_{E.coli} синтез ФНО-α, в то время как исходные ЛПС и другие модифицированные производные являлись частичными антагонистами.

Исследуемые препараты были охарактеризованы по составу и соотношению жирных кислот (ЖК), для липида А ЛПС_{КВС1} установлена первичная структура. ГЖХ анализ показал превалирование в ЛПС_{КВС1} и ЛПС_{КА3} 3-гидроксигексадекановой, 3-гидрокситетрадекановой и додекановой ЖК, кроме того в составе ЛПС_{КА3} идентифицирована гексадекановая ЖК, что, возможно, стало одной из причин различий в биологической активности данных биополимеров.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект № 14-04-01658).

**НОВЫЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ
ЧЕЛОВЕКА С УЛУЧШЕННЫМИ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИМИ
СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОТРАВЛЕНИЙ
ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ ТОКСИНАМИ**

Терехов С.С., Смирнов И.В., Шамборант О.Г., Бобик Т.В.,
Пономаренко Н.А., Габиров А.Г.

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

Бутирилхолинэстераза является естественным антидотом человека при отравлении различными необратимыми ингибиторами ацетилхолинэстеразы, такими как пестициды или боевые отравляющие вещества нервнопаралитического действия. Создание биологических антидотов против фосфорорганических токсинов (ФОТ) является задачей с высокой социальной значимостью. Основным лимитирующим фактором широкого практического применения рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека (рчБуХЭ) является высокая стоимость рчБуХЭ и крайне низкий период полувыведения мономерной рчБуХЭ ($t_{1/2} \approx 3$ минуты). До настоящего времени не существовало клона, способного эффективно продуцировать тетрамерную рчБуХЭ (4рчБуХЭ).

В данной работе были получены клоны-продуценты рчБуХЭ в клетках линии СНО, экспрессирующие БуХЭ исключительно в тетрамерной форме. Этого удалось добиться за счет экспрессии под одним промотором hEF1-NTLV гена чБуХЭ и пролинбогатого пептида, ответственного за тетрамеризацию чБуХЭ (PRAD), разделенных "самопроцессирующим" пептидом F2A. Введение MAR (участков связывания с ядерным матриксом), известных своей способностью обеспечивать стабильную и эффективную экспрессию генов, перед промотором привело к трехкратному увеличению уровня экспрессии. Последующая трансфекция лучшего клона-продуцента дополнительными копиями чБуХЭ под контролем hEF1 промотора позволила отобрать клон-продуцент с уровнем экспрессии в роллерах 70 мг/л олигомерно чистой 4рчБуХЭ.

4рчБуХЭ была очищена в 2 стадии гель-фильтрацией и анионообменной хроматографией и использована в экспериментах *in vivo* по определению фармакокинетических параметров выведения и профиля биораспределения препарата. Было показано, что 4рчБуХЭ обладает многократно улучшенными фармакокинетическими характеристиками ($t_{1/2} = 1730 \pm 170$ мин., $MRT = 2300 \pm 300$ мин.), что позволяет эффективно использовать ее при отравлениях ФОТ. В результате мечения 4рчБуХЭ изотопом ^{125}I , а также NIR-красителем сульфациантин7, удалось установить, что основным органом накопления 4рчБуХЭ является печень, в которой происходит ее деградация с последующим выведением почками с мочой. Протекторное действие 4рчБуХЭ было продемонстрировано на модели отравления пестицидом параоксон. Введение 1,5 мг 4рчБуХЭ в мышь обеспечивает 100% выживаемость при действии летальной дозы параоксона (600 мкг/кг).

**ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ
К ТУБЕРКУЛИНУ, ИММУНОАНАЛИЗА МИКОБАКТЕРИЙ И
ВАКЦИНАЦИИ ЖИВОТНЫХ**

Фомин А.С., Староверов С.А., Щеголев С.Ю., Дыкман Л.А.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
Саратов
Электронный адрес: dykman@ibppm.sgu.ru

В работе предложены новые подходы к получению антител на туберкулин с использованием адьювантных свойств наночастиц золота. Данный подход позволил получить антитела, детектирующие 0.78 нг туберкулина. Были охарактеризованы специфичность и чувствительность полученных антител. Показано, что конъюгаты наночастиц золота с туберкулином влияют на дыхательную и бактерицидную активности перитонеальных макрофагов. Полученные антитела предложено использовать для иммунодиагностики микобактерий туберкулеза с использованием твердофазных, свето- и электронно-микроскопических методов. Приведены результаты вакцинации конъюгатами наночастиц золота с туберкулином морских свинок, показавшие определенный протективный эффект.

Предложенная стратегия получения антител на туберкулин с использованием наночастиц золота в качестве носителя и адьюванта позволяет получить специфичные антитела, которые могут быть использованы в различных методах иммунодиагностики туберкулезной инфекции у животных и, возможно, у человека. Золотые наночастицы за счет проникновения во внутриклеточное пространство частично снимают токсический эффект, оказываемый туберкулином на перитонеальные макрофаги крыс. Это способствует более активному развитию гуморальной реакции и выработке антител на туберкулин. Поэтому золотые наночастицы возможно применять как носитель для получения антител на вещества, обладающие токсическим эффектом. В дальнейшем адьювантные свойства наночастиц золота планируется использовать для создания туберкулиновой противотуберкулезной вакцины.

БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ НАВИГАЦИИ КЛЕТОК

Шаронов Г.В.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Москва

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: sharonov@gmail.com

Механизмы формирования границ тканей, позиционирования и ориентирования отдельных клеток представляют большой интерес для биологии. Долгое время считалось, что границы ткани образуются в результате различной адгезии клеток к клеткам собственной и соседней тканей. Недавние эксперименты показали, что межклеточная адгезия важна, но не является принципиально необходимой для формирования границ тканей. Также очевидно, что адгезия не достаточна для формирования трехмерной архитектуры ткани и придания клеткам особой формы. Яркими примерами являются трубчатые структуры и гексагональная форма эпителиальных клеток. Данные по генетическому нокауту позволили выявить основные гены, отвечающие за формирование границ тканей. Одну группу составляют факторы роста и их рецепторы, которые служат инициаторами морфогенеза. Придание формы тканям и клеткам контролируется рецепторами межклеточных контактов, основными из которых являются эфрины/Eph, кадгерини, а также факторами межклеточной паракринной сигнализации Wnt/Frizzled. Биохимические сигнальные каскады этих рецепторов хорошо изучены, однако они не достаточны для объяснения механизма регуляции трехмерной архитектуры. В основе пространственной регуляции этих рецепторов лежат биофизические механизмы. Так, области мембран клеток, находящиеся на границе ткани, характеризуются повышенным сокращением примембранного актомиозинового цитоскелета. Это сокращение индуцируется вследствие активации эфринных рецепторов и регулирует активность кадгеринов. Сокращение влияет на натяжение прилегающего липидного бислоя плазматической мембраны, что приводит к изменению микродоменной структуры и, как следствие, к изменению распределения и активности рецепторов. Рост сосудов и нервов начинается с формирования тонких выростов, натяжение бислоя и высокая кривизна которых обуславливает их особые сенсорные свойства. Таким образом, навигационные свойства рецепторов тесно связаны со свойствами мембраны. В докладе будет представлен обзор актуальных представлений, а также собственные данные о биофизических механизмах навигации клеток и взаимодействии навигационных рецепторов с мембраной.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-24-00086.

ПОТЕНЦИАЛОЗАВИСИМЫЕ КАТИОННЫЕ КАНАЛЫ: ОТ СТРУКТУРЫ ОТДЕЛЬНЫХ ДОМЕНОВ ДО МЕХАНИЗМОВ РАБОТЫ И РЕГУЛЯЦИИ

Шенкарев З.О.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: zakhar-shenkarev@yandex.ru

Потенциалозависимые катионные (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) каналы (K_v , Na_v , Ca_v) играют важную роль в функционировании сердечно-сосудистой, нервной и мышечной систем организма, в частности, отвечая за проведение нервного импульса. Нарушение работы этих каналов приводит к развитию ряда заболеваний, например, судорожных расстройств, периодического паралича, миотонии, атаксии, аритмий, мигрени и хронической боли. Потенциалозависимые каналы имеют гомологичное модульное строение и состоят из четырех одинаковых субъединиц (K_v) или четырех псевдосубъединиц в составе слитной полипептидной цепи (α -субъединица Na_v и $\alpha 1$ -субъединица Ca_v), окружающих ионную пору. Каждая из псевдосубъединиц включает в себя потенциалочувствительный (рецепторный) домен (ПЧД), сформированный четырьмя трансмембранными (ТМ) спиралями (S1-S4), и фрагмент (S5-S6), участвующий в формировании поры. Функцию датчика ТМ потенциала выполняет спираль S4, которая содержит несколько (обычно 4) консервативных положительно заряженных остатков (Arg или Lys), и, вероятно, значительно изменяет свое положение в мембране под действием электрического поля. Особенное строение имеет потенциалозависимый протонный канал фагоцитов (H_v), который образован двумя ПЧД, каждый из которых способен осуществлять потенциалозависимую проводимость ионов H^+ . ПЧД каналов являются мишенями для "вольт-сенсорных" токсинов из ядов паукообразных, которые, связываясь с участками домена, погруженными в мембрану, блокируют потенциалозависимую активацию.

Модульная организация потенциалозависимых каналов позволяет предположить, что в некоторых случаях задачи изучения каналов могут быть упрощены и сведены к исследованию фрагментов, содержащих изолированный ПЧД. В докладе приводятся результаты последних структурных исследований как полноразмерных потенциалозависимых каналов, так и их изолированных доменов. Результаты, полученные для изолированного ПЧД канала K_vAP , позволяют по-новому взглянуть на механизмы взаимодействия K_v каналов с вольт-сенсорными токсинами пауков.

ГИБРИДНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДОСТАВКИ К КЛЕТКАМ *IN VITRO* И *IN VIVO*

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

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

² Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва.
Электронный адрес: viktoriya.shipunova@phystech.edu

Ряд интересных свойств магнитных наночастиц (МНЧ) делает их весьма привлекательными объектами для разработки новых подходов к терапии и диагностики различного рода заболеваний, а также для других биомедицинских применений с использованием "умных материалов". Чем же вызван этот интерес?

В силу своей уникальной физической природы магнитные наночастицы являются многофункциональными объектами и, наряду с магнетизмом, особенно важным их свойством является возможность специфической и неспецифической модификации их поверхности различными биомолекулами, обеспечивающими их биологическую активность, а также возможность создания различных конструкций программируемого и направленного действия под воздействием различных внешних факторов (1). Под специфической модификацией МНЧ подразумевается оснащение их поверхности направляющими агентами (например, антителами и их производными), избирательно взаимодействующими только с определенным типом клеток, а также токсичными и/или визуализирующими модулями (2). Такие "нацеленные" МНЧ используются для магнитной сепарации, методов иммуноанализа, гипертермии опухолевых тканей, а также в качестве "тераностических" агентов.

В случае неспецифической модификации поверхность МНЧ покрывается полимерами и различными амфифильными молекулами, которые могут непосредственно модифицировать клеточную поверхность, например, за счет электростатического взаимодействия, что вызывает интерес в регенеративной медицине: для инженерии тканей и клеточной терапии.

В представленной работе описываются получение и характеристика МНЧ с полиэтилениминовой оболочкой, которые способны с высокой степенью эффективности связываться с клеточной поверхностью, не повреждая клетку и сохраняя ее жизнеспособность (3). Также описывается получение МНЧ для селективного мечения клеток эукариот, способных специфично и контролируемым образом связываться с поверхностью клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. С целью полноценного исследования взаимодействия полученных конструкций с клетками разработан и реализован принципиально новый метод количественной детекции связывания наночастиц с клетками на основе детекции нелинейных магнитных материалов на комбинаторных частотах (4).

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-04-32325 мол_а.

Литература

1. Nikitin M.P., Shipunova V.O., Deyev S.M., Nikitin P.I. (2014) Biocomputing based on particle disassembly. *Nat Nanotechnol* 9(9):716-22.
2. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. (2003) Design of multivalent complexes using the barnase*barstar module. *Nat Biotechnol* 21(12):1486-92.
3. Шипунова В.О., Никитин М.П., Лизунова А.А., М.А. Ермакова, Деев С.М., Петров Р.В. Магнитные наночастицы с полиэтилениминовой оболочкой для модификации клеток (2013) Доклады Академии Наук 452(3):333-335.
4. Nikitin M.P., Torno M., Chen H., Rosengart A. and Nikitin P.I. (2008) Quantitative real-time *in vivo* detection of magnetic nanoparticles by their nonlinear magnetization. *J Appl Phys* 103:07A304.

ФАРМАКОФОРНЫЕ МОДЕЛИ ПОЛИПЕПТИДНЫХ НЕЙРОТОКСИНОВ ЯДА СКОРПИОНОВ

Ширишков Ф.В., Кузьменков А.И., Василевский А.А., Чугунов А.О., Ефремов Р.Г.

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

Электронный адрес: shrshkv@ya.ru

Токсины ядов животных - основа ряда фармакологических методов изучения принципов функционирования ионных каналов. Объектом настоящего исследования стали полипептидные нейротоксины яда скорпионов, способные избирательно блокировать ионные токи через потенциал-управляемые калиевые каналы трёх типов: $K_v1.1$, $K_v1.2$ и $K_v1.3$. Среди природного многообразия нейротоксинов в яде скорпионов обнаруживаются как строго селективные блокаторы, так и токсины с множественной биологической активностью. Цель исследования заключалась в поиске групп аминокислотных остатков, образующих в пространственной структуре нейротоксинов фармакофор, позволяющий им связываться с каналом-мишенью. С помощью моделирования по гомологии для токсинов с неизвестной третичной структурой получены модели их пространственной организации. Для учёта динамического поведения полипептидной цепи проводилось моделирование молекулярной динамики нейротоксинов в водном растворе. При анализе распределения гидрофобных свойств на молекулярной поверхности рассматриваемых токсинов использовали метод белковой топографии [1].

Сравнительный анализ физико-химических свойств нейротоксинов, селективных только на ионные каналы $K_v1.2$, позволил идентифицировать в их пространственной структуре потенциальный канал-специфичный фармакофор, обладающий стереоизомерией. Последняя характеризуется осевым видом хиральности. При этом ось хиральности образуется за счёт двух катионных фармакофорных центров. Полученные результаты указывают на возможность существования фармакофора вышеописанной группы нейротоксинов в виде левой и правой форм. На основе анализа молекулярной поверхности калиевого канала $K_v1.2$ вблизи селективного фильтра показаны предполагаемые способы связывания нейротоксинов с калиевым каналом $K_v1.2$, в зависимости от пространственной конфигурации фармакофора. По всей видимости, взаимодействие токсинов с калиевыми каналами происходит по более тонкому механизму, нежели следует из постулированной ранее концепции функциональной диады [2], что важно учитывать при рациональной модификации нейротоксинов с целью модуляции их биологической активности.

Литература

- [1] Koromyslova A. D., Chugunov A. O., Efremov R. G. // *J. Chem. Inf. Model.* (2014), 54 (4): 1189-99.
- [2] Mouhat S., De Waard M., Sabatier J.-M. // *J. Pept. Sci.* (2005), 11 (2): 65-8.

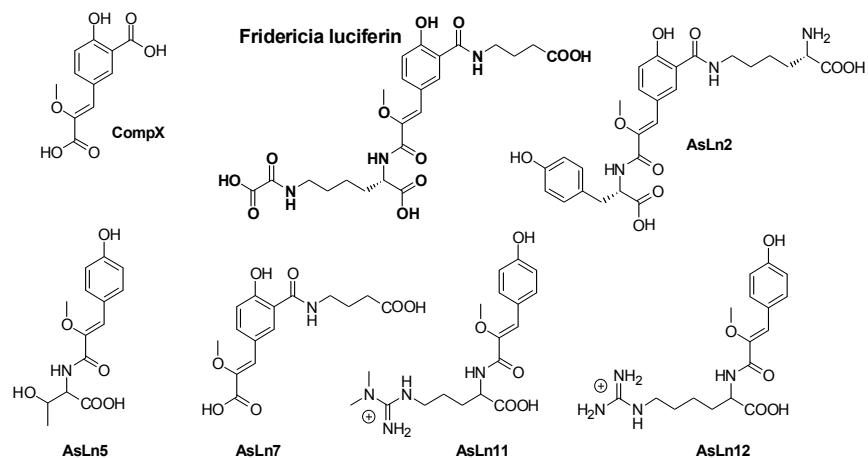
НОВАЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ СИСТЕМА ЧЕРВЯ *FRIDERICIA HELIOTA*

*Ямпольский И.В.*¹, *Дубинный М.А.*¹, *Царькова А.С.*¹, *Петушков В.Н.*², *Родионова Н.С.*², *Каскова З.М.*¹, *Баранов М.С.*¹, *Гороховатский А.Ю.*¹, *Котлобай А.А.*¹

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

² Институт биофизики РАН, Красноярск
Электронный адрес: ivuamp@ibch.ru

Методами ЯМР, МС и встречного синтеза установлена структура нового субстрата биолюминесцентной реакции - люциферина почвенного малощетинкового червя *F. heliota*, а также продукта его АТФ-зависимого окисления в присутствии люциферазы. Установлены структуры ряда аналогов люциферина - необычных модифицированных пептидов, строение которых уникально для наземных животных.



Литература

1. Dubinnyi MA, Petushkov VN, Tsarkova AS, Rodionova NS, Baranov MS, Yampolsky IV. submitted. Novel mechanism of bioluminescence: oxidative decarboxylation outside of light-emitting moiety in luciferin from Siberian earthworm *Fridericia heliota*.
2. Tsarkova AS, Dubinnyi MA, Baranov MS, Petushkov VN, Rodionova NS, Yampolsky IV. Mendeleev Comm. 2015, accepted. Total synthesis of AsLn2 - a luciferin analog from the Siberian bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*.
3. Tsarkova AS, Petushkov VN, Mineev KS, Dubinnyi MA, Rodionova NS, Baranov MS, Yampolsky IV. J. Nat. Prod. 2015, accepted. AsLn7 - a luciferin analog from bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*: structure elucidation and total synthesis
4. Petushkov VN, Dubinnyi MA, Tsarkova AS, Rodionova NS, Baranov MS, Kublitski VS, Shimomura O., Yampolsky IV. Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 22, 5566-5568. A novel type of luciferin from Siberian luminous earthworm *Fridericia heliota*: structure elucidation by spectral studies and total synthesis.
5. Petushkov VN, Dubinnyi MA, Rodionova NS, Nadezhdin KD, Marques SM, Esteves da Silva JCG, Shimomura O, Yampolsky IV, Tetrahedron Lett. 2014, 55, 463-465. AsLn2, a luciferin-related modified tripeptide from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*,
6. Petushkov VN, Tsarkova AS, Dubinnyi MA, Rodionova NS, Marques SM, Esteves da Silva JCG, Shimomura O, Yampolsky IV. Tetrahedron Lett. 2014, 55, 460-462. CompX, a luciferin-related tyrosine derivative from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. Structure elucidation and total synthesis.

ТЕЗИСЫ СТЕНДОВЫХ СООБЩЕНИЙ

СЕКЦИЯ 1

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ. БИОКАТАЛИЗ

1.1. ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ПРОДУЦЕНТА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 (IL-4)

Алкон Н.С.¹, Лежнин Ю.Н.^{1,2}, Чумаков С.П.¹

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

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва
Электронный адрес: h.v.ishni@mail.ru

В настоящее время ведется интенсивный поиск новых путей направленной доставки высокоэффективных противораковых препаратов к опухолям разных типов. Одним из таких способов может быть презентация специфических антигенов раковых клеток, и, возможно, раковых стволовых клеток (РСК) генетически-модифицированным опухолеспецифичным Т-лимфоцитам, секретирующим рекомбинантный онкотоксический белок. Раковые стволовые клетки – особо выделяемая некоторыми исследователями популяция раковых клеток, изученная для опухолей некоторых видов, обладающая способностью к самовоспроизведению и образованию всех возможных типов опухолей. Хотя гипотеза РСК все еще может вызывать некоторые вопросы, нет сомнения в том, что некоторые опухоли представляют собой гетерогенные клеточные популяции, среди которых можно выделить особую группу клеток, устойчивых к консервативным методам лечения и часто ответственных за возникновение рецидивов и метастазов. Многие авторы склонны считать, что традиционные методы лечения в совокупности с новыми стратегиями, направленными на элиминацию таких клеточных групп, позволят достигнуть оптимального терапевтического эффекта. Особый интерес вызывает белок апоптин, обладающий способностью, не вызывая гибели здоровых клеток, специфично элиминировать раковые клетки, блокируя G2/M фазы их клеточного цикла.

В качестве антигенпрезентирующих клеток, экспонирующих антигены раковых клеток для их последующего распознавания Т-лимфоцитами, предполагается использовать миелоидные дендритные клетки, которые можно получить путем трансдифференциации клеток моноцитарной линии крови под действием цитокинов IL-4 и GM-CSF.

Для этих целей в ходе лабораторных работ был получен и очищен белок IL-4. Во избежание неправильного посттрансляционного процессинга (фолдинга) данного белка, для получения его в N-гликозилированном виде, а также для того, чтобы исключить контаминацию бактериальным эндотоксином, белок экспрессировался в рекомбинантной клеточной линии НЕК-293Т. Для получения продуцентов IL-4 клетки НЕК293Т были трансфицированы плазмидами, кодирующими компоненты лентивектора,

pVSV-G, pDelta8.2, и модифицированной плазмидой pLCMV-IL4-10xHT-puro, сконструированной на основе pLCMV-Puro плазмиды путем вставки в нее кДНК интерлейкина-4 с присоединенной полигистидиновой (His10) меткой на 3'-конце. Очистка белка IL-4 из бессывороточной культивационной среды была проведена с помощью афинной металлохелатной хроматографии с матрицей на основе никеля и нитрилтрехуксусной кислоты (Ni-NTA). Достоверность выделенного и очищенного IL-4 была подтверждена белковым электрофорезом в денатурирующих условиях и иммуноблоттингом с использованием антител к полигистидиновой метке. Белок был сконцентрирован и очищен от примесей путем ультрафильтрации, концентрация определена с помощью реактива Брэдфорда, его биологическая активность, определенная путем измерения интенсивности пролиферации клеточной линии TF-1, составила 6 нг/мл. Мы надеемся, что оптимизация условий культивации рекомбинантного продуцента интерлейкина-4 приведет к большему количественному выходу белка.

Работа финансировалась из средств субсидии МОН 14.607.21.0062.

1.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ЭУКАРИОТИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eIF2 β И eIF5

Архипова В.И., Митрошин И.В., Столбоушкина Е.А., Гарбер М.Б.

Институт белка РАН, Пушкино

Электронный адрес: avalenti@rambler.ru

Ключевую роль в процессе инициации биосинтеза белка у эукариот играет гетеротримерный фактор инициации трансляции 2 (eIF2 альфа, бета, гамма), который в ГТФ-связанном состоянии доставляет инициаторную метионил-тРНК (Met-тРНКi) в Р участок малой рибосомной субчастицы. Здесь происходит точное узнавание инициаторного кодона мРНК антикодоном тРНКi, и под действием eIF5 (ГТФаза-активирующий белок, GAP) осуществляется гидролиз ГТФ в тройственном комплексе Met-тРНКi·eIF2·ГТФ. После ухода неорганического фосфата фактор eIF5, по всей видимости, более прочно взаимодействует с eIF2, находящимся в ГДФ-связанной форме, и такой комплекс покидает рибосому. В составе комплекса eIF2·ГДФ·eIF5 фактор eIF5 играет роль ингибитора диссоциации ГДФ (GDI), благодаря чему способствует точному контролю инициации трансляции (eIF5 - мономерный белок, состоящий из двух доменов, соединенных междоменной перетяжкой). Известны пространственные структуры обоих доменов eIF5. N-Концевой домен (NTD) eIF5 ответственен за выполнение GAP функции, по-видимому, за счет взаимодействия eIF5-NTD с гамма-субъединицей eIF2. С-Концевой домен (CTD) eIF5 участвует во взаимодействии с eIF2 β и вместе с междоменной перетяжкой отвечает за выполнение GDI функции. Комплекс eIF2·eIF5 является функционально-важным компонентом системы инициации трансляции, и его структура вызывает большой интерес.

В данной работе мы исследуем взаимодействие между eIF5 и eIF2 β из *Saccharomyces cerevisiae*. На сегодняшний день структура бета-субъединицы eIF2 неизвестна, определена только структура его архейного гомолога aIF2 β , гомологичного С-концевому домену бета-субъединицы эукариотического фактора. Физико-химические исследования показали, что N концевой домен eIF2 β неупорядочен и структурируется при взаимодействии с eIF5-CTD. Таким образом, кристаллизация eIF2 β в комплексе с eIF5 позволит стабилизировать структуру бета-субъединицы eIF2 и повысить шансы получить высокоупорядоченные кристаллы этого функционально важного комплекса. В рамках данной работы были образованы комплексы eIF2 β ·eIF5-CTD и eIF2 β ·NTD·eIF5-CTD и проведен поиск условий их кристаллизации. В настоящее время получены кристаллы комплекса eIF2 β ·NTD·eIF5-CTD.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и грантом РФФИ.

1.3. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА АДФ-РИБОЗИЛИРОВАНИЯ АКТИНА ЙОТА-ТОКСИНОМ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Белый А.Ю., Совкова И.В.

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Электронный адрес: xbelyi@yandex.ru

Йота-токсин *Clostridium perfringens* - хорошо изученный бинарный токсин: А-субъединица (Ia) является АДФ-рибозилтрансферазой, которая разрушает клеточный цитоскелет путём модификации R177 в молекуле G-актина, В-компонент отвечает за транслокацию А-субъединицы в клетку-мишень. Структурно-функциональный анализ Ia был проведён несколькими научными группами, в то время как участие ключевых аминокислот актина в реакции его модификации изучено недостаточно.

Ранее на основе кристаллической структуры комплекса Ia-актин был предложен механизм АДФ-рибозилирования актина (Tsurumura et al 2013). Помимо участка модификации R177 важная роль придавалась аминокислоте D179, которая могла быть необходима для стабилизации промежуточного состояния реакции. Однако *in vitro* или *in vivo* эксперименты, подтверждающие роль этой аминокислоты, проведены не были. Таким образом, цель нашей работы была изучить роль D179 молекулы актина в модификации субстрата йота-токсином *C. perfringens*.

Первоначально мы получили штаммы дрожжей, где актин дикого типа был заменён на молекулы с заменами R177K, D179E, D179A или D179K. Все полученные штаммы демонстрировали сходный ростовой фенотип, что указывает на функциональность всех вариантов актина. Далее мы провели *in vitro* ³²P-АДФ-рибозилирование дрожжевых лизатов с использованием рекомбинантного Ia. Уровни модификации актина дикого типа и вариантов с заменами D179 существенно не различались, в то время как реакции с актином-R177K не наблюдалось. Использование очищенных препаратов показало сходный уровень кинетики реакции с актином дикого типа, актином-D179A и актином-D179E, в то время как актин-D179K модифицировался слабее. Последнее наблюдение могло быть связано с локальными структурными изменениями молекулы актина при замене отрицательно-заряженного аминокислотного остатка аспарагиновой кислоты на положительно-заряженный лизин.

Таким образом, эксперименты с дрожжевыми экстрактами и выделенным актином показывают, что аминокислотный остаток D179 не является ключевым при модификации актина и что предложенный ранее механизм АДФ-рибозилирования нуждается в уточнении.

1.4. ИЗУЧЕНИЕ НОВОГО ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА ГОРОХА Ps-LTP1

Богданов И.В., Финкина Е.И., Овчинникова Т.В.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва.

Электронный адрес: contraton@mail.ru

Растительные липид-транспортирующие белки (ЛТП) составляют класс основных мультифункциональных белков, обладающих способностью связывать и переносить липиды, а также ингибировать рост фитопатогенных микроорганизмов. Известно, что представители данного класса белков являются сильными аллергенами, ответственными за развитие аллергических реакций на пыльцу и растительные пищевые продукты. Разработка биотехнологических способов получения рекомбинантных растительных аллергенов является важным этапом на пути создания современных тест-систем для диагностики аллергии.

В последние десятилетия пищевая аллергия переросла в глобальную медико-социальную проблему. Ранее считалось, что пищевая аллергия к бобовым встречается относительно редко, однако в последние годы отмечается значительный рост аллергических реакций на эти продукты. Целью работы являлись поиск, выделение и структурно-функциональная характеристика липид-транспортирующего белка из гороха посевного *Pisum sativum*, предположительно являющегося основным аллергеном этого представителя семейства бобовых. Из экстракта семян гороха был выделен новый липид-транспортирующий белок, названный Ps-LTP1. Для изучения структурно-функциональных свойств Ps-LTP1 был разработан биотехнологический способ получения его рекомбинантного аналога. Для этого была создана генно-инженерная конструкция для экспрессии ЛТП гороха в виде гибридного белка His8-TrxL-Ps-LTP1, а также проведена оптимизация условий экспрессии данного белка в клетках *E. coli* и разработана схема выделения и очистки целевого белка. Методами МАЛДИ масс-спектрометрии, КД-спектроскопии, SDS-электрофореза в ПААГ и N-концевого секвенирования по методу Эдмана была подтверждена идентичность рекомбинантного Ps-LTP1 природному белку. Было проведено исследование способности Ps-LTP1 ингибировать рост фитопатогенных микроорганизмов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 13-08-00956).

1.5. СРАВНЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ГОМЕЗИНА И ТАХИПЛЕЗИНА

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

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

Антимикробные пептиды (АМП) - компоненты системы врожденного иммунитета различных живых организмов. АМП проявляют широкий спектр биологической активности, на которую влияют размер, заряд, гидрофобность и амфифильность молекул. Некоторые представители антимикробных пептидов обладают противоопухолевым действием. Ранее были проведены исследования *in vitro* и *in vivo*, которые показали избирательную токсичность ряда АМП по отношению к опухолевым клеткам. Для катионных АМП селективность противоопухолевого действия можно объяснить их повышенным сродством к клеткам опухоли, плазматические мембраны которых несут отрицательный заряд, обусловленный более высоким содержанием фосфатидилсерина по сравнению с нормальными клетками. В то же время было показано, что даже близкие по структуре и свойствам катионные АМП могут проявлять различную активность по отношению к разным видам опухолевых клеток.

В данной работе были изучены противоопухолевые свойства катионных β -спилечных пептидов гомезина из гемоцитов паука *Acanthoscurria gomesiana* и тахиплезина I из гемоцитов мечехвоста *Tachypleus tridentatus*. Исследована цитотоксичность гомезина и тахиплезина на пяти опухолевых и трех нормальных клеточных линиях. Все исследованные клеточные линии оказались чувствительными к обоим АМП, однако эффективность воздействия гомезина и тахиплезина на различные опухолевые клетки существенно различалась. Наиболее чувствительной к гомезину и тахиплезиону оказалась клеточная линия рака шейки матки HeLa. В целом, гомезин является более токсичным для опухолевых клеток, чем тахиплезин. Одновременно гомезин является более токсичным и для нормальных клеток человека. Оба пептида проявляют цитотоксическую активность как в присутствии белков сыворотки, так и в их отсутствие.

Работа поддержана грантом ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы" (соглашение № 14.604.21.0104, уникальный идентификатор RFMEF160414X0104).

1.6. ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АРЕНИЦИНА

Калашикова М.Б., Кузьмин Д.В., Пантелеев П.В., Баландин С.В.,
Овчинникова Т.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: thpcb92@mail.ru

В настоящее время существуют различные подходы к лечению онкологических заболеваний, основными из которых являются следующие: хирургическое удаление опухолей, лучевая терапия, применение химиотерапевтических, в том числе мишень-направленных, или таргетных, препаратов. Хирургическое лечение не всегда представляется возможным, и не все опухоли являются одинаково чувствительными к лучевой терапии. К химиотерапевтическим препаратам, в том числе и к более современным таргетным средствам, может развиваться устойчивость опухолей, что делает лечение неэффективным.

Антимикробные пептиды (АМП) - перспективная группа биологически активных молекул, обладающих широким спектром действия. Для некоторых АМП было показано селективное цитотоксическое действие на опухолевые клетки. Эти соединения являются кандидатами для создания противоопухолевых препаратов, которые могли бы преодолевать механизмы развития устойчивости опухолей, сохраняя при этом свою активность. Особый интерес представляет один из наиболее активных классов природных АМП - β -спилечные пептиды.

В данной работе на пяти опухолевых и трех нормальных клеточных линиях человека были исследованы цитотоксические эффекты представителя катионных β -спилечных пептидов ареницина-1. Ареницин-1 был выделен из целомотитов морского червя *Arenicola marina*. Выявлены различия в чувствительности опухолевых клеточных линий по отношению к ареницину-1. Наиболее чувствительная к ареницину-1 линия - трансформированные клетки почки человека HEK293. В присутствии белков сыворотки ареницин-1 не действовал на клеточные линии эпидермоидной карциномы A431 и карциномы молочной железы SKBR-3. При действии на другие опухолевые линии клеток цитотоксическое действие пептида снижалось в присутствии сывороточных белков. Было показано, что ареницин-1 не токсичен по отношению к фибробластам.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МК-6023.2014.4).

1.7. ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ЭНДОПЕПТИДАЗЫ Л1 *LYSOBACTER* SP. XL1

Каратовская А.П.^{1,2}, Руденко Н.В.^{1,2}, Цфасман И.М.³, Гусева К.А.^{1,2}, Бровко Ф.А.^{1,2}, Васильева Н.В.³

¹ Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

² Филиал Института биорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

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

Электронный адрес: annakaratovskaya@mail.ru

Грамотрицательная бактерия *Lysobacter* sp. XL1 секретирует в окружающую среду несколько бактериолитических ферментов (Л1, Л2, Л3, Л4, Л5), лизирующих широкий спектр микроорганизмов. Для оценки вклада каждого из этих ферментов в общую литическую активность необходимо знать их содержание и количественное соотношение в культуральной жидкости. Важным вопросом также является механизм секреции этих ферментов в окружающую среду. Показано, что эндопептидазы Л1 и Л5 синтезируются в виде препробелков. Фермент Л5 секретируется с помощью внешне мембранных везикул, а Л1 - другим способом.

С помощью чувствительного количественного сэндвич-иммуноферментного анализа на основе моноклональных антител к отдельным бактериолитическим ферментам *Lysobacter* sp. XL1 можно измерить их содержание в культуральной жидкости, а также внутри клеток, что поможет понять особенности их секреции в окружающую среду. Задача данной работы состояла в оценке содержания эндопептидазы Л1 в культуральной жидкости и в клеточных фракциях бактерии *Lysobacter* sp. XL1 разработанным сэндвич-иммуноферментным анализом.

Содержание эндопептидазы Л1 в культуральной жидкости *Lysobacter* sp. XL1 составило 10-16 нг/мл после 12 часов культивирования и 300-400 нг/мл после 20 часов. Эти данные коррелируют с уровнем литической активности. В лизате клеток *Lysobacter* sp. XL1 после 20 часов культивирования выявлено около 0,056 нг/ОЕ₅₄₀⁷, что гораздо меньше его содержания в культуральной жидкости - около 90 нг/ОЕ₅₄₀⁷. При анализе клеточных фракций эндопептидаза Л1 обнаружена только в периплазматической фракции (0,05 нг/ОЕ₅₄₀⁷).

Таким образом, сэндвич-ИФА на основе моноклональных антител против фермента Л1 *Lysobacter* sp. XL1 позволяет с высокой чувствительностью измерять количество этого фермента в различных биологических жидкостях. Полученные данные свидетельствуют о том, что секреция в окружающую среду фермента Л1 происходит очень быстро и внутри клеток он не накапливается.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-00644.

1.8. РОЛЬ N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА АТР-ЗАВИСИМОЙ Lon-ПРОТЕАЗЫ ИЗ *E. COLI* В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ФЕРМЕНТА И В СВЯЗЫВАНИИ ДНК

Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Широкова А.И., Серова О.В., Андреанова А.Г.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: kudzhaev_arsen@mail.ru

Бифункциональная гомогекомерная протеаза Lon из *E. coli* (Ec-Lon) относится к суперсемейству AAA⁺-белков (АТР-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями) и является ключевым участником системы контроля качества клеточного протеома в бактериях и эукариотах. Фермент деградирует аномальные и дефектные полипептиды, а также ряд регуляторных белков по процессивному механизму. Отличительной характеристикой Ec-Lon-протеазы служит способность к связыванию ДНК. Субъединица Ec-Lon образована пятью доменами - N-концевым (N), первым α -спирализованным, включающим участок с coiled-coil(CC)-конформацией (Н(СС)), нуклеотидсвязывающим (NB), вторым α -спирализованным (H) и протеолитическим (P): N-Н(СС)-NB-H-P, где АТР-азным компонентом является фрагмент NB-H (или AAA⁺-модуль). В последнее время установлено, что N-домен Ec-Lon топологически подобен РНК-связывающим PUA-доменам, обнаруженным в псевдоурдинсинтазе и других РНК-связывающих белках. Вместе с тем, его роль в функционировании Ec-Lon-протеазы, во взаимодействии с нуклеиновыми кислотами и/или в структурной организации фермента до настоящего времени не охарактеризована.

Для выявления структурно-функциональной роли N-домена Ec-Lon-протеазы получена укороченная форма фермента Ec-Lon(107-784) (или Lon107), в которой отсутствует N-концевой фрагмент, включающий 106 аминокислотных остатков, а также ее мутант с заменой каталитического остатка серина (Lon107-S679A). Охарактеризованы свойства укороченных форм в сравнении со свойствами интактной Ec-Lon-протеазы и ее мутанта Ec-Lon-S679A. Исследовано влияние классических эффекторов АТР-зависимых протеаз - нуклеотидов различной природы и ионов магния - на АТР-азную, протеолитическую и пептидазную активности, а также на олигомерное состояние укороченных ферментов и их способность к связыванию ДНК.

1.9. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА УКРОПА ОГОРОДНОГО *ANETHUM GRAVEOLENS*

Мельникова Д.Н., Минеев К.С., Рычкова М.Е., Финкина Е.И., Арсеньев А.С., Овчинникова Т.В.

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

Липид-транспортирующие белки растений (ЛТР) - один из функционально значимых классов белков, обладающих способностью связывать липидные молекулы и обеспечивать их транспорт. ЛТР в растениях выполняют широкий спектр функций, в том числе участвуют в образовании кутина, эмбриогенезе, симбиозе и адаптации растений к различным условиям окружающей среды. Предполагается также, что ЛТР являются важным составным элементом защитной системы растений, так как эффективно подавляют рост фитопатогенов *in vitro*.

Для структурно-функциональных исследований липид-транспортирующего белка укропа *Anethum graveolens* (Ag-LTP) были получены рекомбинантный белок и его ¹³C, ¹⁵N-меченый аналог. Клетки *E. coli* BL-21(DE3), трансформированные плазмидой pET-His8-TrxL-Ag-LTP, выращивали при пониженной температуре в среде LB или в бедной среде, содержащей ¹⁵NH₄Cl и [¹³C]-D-глюкозу в качестве единственных источников азота и углерода, соответственно. Очистка целевых белков включала получение растворимой фракции клеточного белка, металлохелатную хроматографию, диализ, расщепление гибридного белка бромцианом, повторную металлохелатную хроматографию и ОФ-ВЭЖХ. Исследования функциональной активности Ag-LTP показали, что белок обладает умеренной антимикробной активностью в отношении ряда фитопатогенных микроорганизмов и связывает насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, а также природный регулятор роста растений - жасмоновую кислоту.

Методом ЯМР-спектроскопии была определена пространственная структура липид-транспортирующего белка Ag-LTP в водном растворе. Структура белка стабилизирована 4 дисульфидными и 40 внутримолекулярными водородными связями и представляет собой связку из четырех α-спиралей, содержащую длинную неупорядоченную петлю в C-концевом участке молекулы. Неполарные аминокислотные остатки Ag-LTP формируют характерную для липид-транспортирующих белков гидрофобную полость, в которой локализован сайт связывания липидных молекул. Внешняя поверхность Ag-LTP образована полярными остатками и не содержит выраженных гидрофобных участков, которые могли бы участвовать в связывании с липидными мембранами.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 13-08-00956).

1.10. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ ОПТИЧЕСКИМИ И ГИДРОДИНАМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Михайлов Н.В.¹, Созонова А.А.¹, Ролич В.И.¹, Чихиржина Е.В.², Поляничко А.М.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Электронный адрес: nikitamihailov.bio.ph@gmail.ru

Гистон H1 и негистоновый белок HMGB1 связываются с ДНК на линкерном участке в месте входа/выхода ДНК на нуклеосоме. При этом гистон H1 и белок HMGB1 имеют в своей аминокислотной последовательности разноименно заряженные концевые участки, посредством которых может осуществляться их взаимодействие. Целью данной работы является определение характера взаимодействия этих белков.

Методом динамического светорассеяния было показано, что в водно-солевых растворах каждого из белков в отдельности доминирует фракция мономеров, доля гетеродимеров при этом не превышает 0.01% от общего числа. В растворе, содержащем гистон H1 и HMGB1 в массовом соотношении 1:1, белки присутствуют предпочтительно в форме гетеродимеров и гетероолигомеров. Предварительные исследования методом статического светорассеяния показали, что олигомеры БСА имеют рыхлую структуру, что позволило предположить, что гетероолигомеры H1-HMGB1 также не имеют компактной упаковки. Также методы светорассеяния и гель-электрофореза были применены для исследования влияния параметров раствора и растворителя на агрегаты и определения природы сил, образующих агрегаты. Также методом аналитического ультрацентрифугирования было получено подтверждение наличия межбелкового взаимодействия.

Авторы признательны Т.Ю. Старковой (Институт цитологии РАН) за любезно предоставленные препараты белков, а также за помощь в проведении экспериментов. Часть работ выполнена на оборудовании ресурсного центра "Центр диагностики функциональных материалов для медицины фармакологии и нанoeлектроники".

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 12-08-01134.

1.11. ИЗУЧЕНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ BSA И H1 МЕТОДАМИ ИК- И КД-СПЕКТРОСКОПИИ

Романов Н.М.¹, Баранова Ю.Г.¹, Чихиряева Е.В.², Поляничко А.М.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Электронный адрес: kal9mbda@mail.ru

Традиционно для определения вторичной структуры белков используется метод кругового дихроизма (КД), который даёт хорошую оценку степени α -спиральности белка. Используя репрезентативный набор белков с известной вторичной структурой, можно проанализировать вклад во вторичную структуру β -слоёв. Применительно к анализу вторичной структуры белков метод ИК спектроскопии несколько более информативен и позволяет различить в составе белка до 5-7 подтипов вторичной структуры.

В данной работе использовали методы ИК- и КД-спектроскопии для анализа вторичной структуры двух различных по своей структуре и аминокислотному составу белков: бычьего сывороточного альбумина (БСА) и гистона H1. Полученные результаты о вторичной структуре БСА хорошо соотносятся с данными, полученными другими авторами методом рентгеноструктурного анализа. Однако, нами были выявлены некоторые расхождения количественных оценок параметров вторичной структуры при регистрации ИК-спектров в режиме пропускания и с использованием ячейки нарушенного полного внутреннего отражения. Мы полагаем, что сочетание описанных методик позволяет получить наиболее полную информацию о вторичной структуре исследуемых белков.

Часть исследований проведены в ресурсном центре СПбГУ "Оптические и лазерные методы исследования вещества".

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ.

1.12. МЕТОД СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР В ИССЛЕДОВАНИИ ПАУЧЬИХ ЯДОВ НА ПРИМЕРЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ЦИТОЛИТИЧЕСКОГО N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА БЕЛКА OtTx1a

Романовская Д.Д.¹, Надеждин К.Д.^{1,2}, Сачкова М.Ю.², Ковальчук С.И.², Василевский А.А.², Гришин Е.В.², Арсеньев А.А.^{1,2}

¹ Московский физико-технический институт (государственный университет)

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

Паучьи яды - сложные многокомпонентные системы с широким спектром биологического действия. Изучив структуры и поняв механизмы действия этих ядов, мы сможем использовать их свойства при создании новых антибиотиков и анальгетиков пептидной природы.

Объектом исследований в данной работе стал двудомный белок OtTx1a, выделенный из яда паука *Oxyopestakobius* и состоящий из двух модулей, соединенных между собой коротким линкером. N-Концевой модуль длиной 40 остатков обладает цитотоксической активностью против широкого спектра патогенов. В то же время C-концевой модуль (60 остатков) по своим свойствам напоминает нейротоксины. [1]

Исследование проводилось методом спектроскопии ЯМР. Этот метод основан на регистрации переходов с низкого дискретного состояния на более высокое из-за воздействия на систему радиочастотным полем. В нашей работе мы использовали спектроскопию на ядрах водорода ¹H и изотопах углерода ¹³C естественного природного содержания. Анализ полученных спектров позволяет определить точную пространственную структуру белка.

В воде основная цепь пептида не упорядочена. При добавлении среды, имитирующей мембранное окружение мицелл додецилфосфохолина (DPC), основная цепь пептида сворачивается в альфа-спиральную конформацию. Структура N-концевого домена белка OtTx1a состоит из двух альфа-спиральных фрагментов, соединенных между собой коротким линкером. Амфипатическая природа поверхности предполагает поверхностное связывание пептида с мицеллами - гидрофобные остатки цепляются за жирные хвосты молекул детергента, а положительно заряженные боковые группы взаимодействуют с липидными головками и растворителем.

Эти данные находятся в полном согласии с ранее полученными результатами методом кругового дихроизма и теоретическим анализом аминокислотной последовательности пептида.

Полученные результаты позволяют по-новому взглянуть на молекулярные механизмы антимикробных свойств пептидов.

Литература

[1] Vassilevski A.A., Sachkova M.Y., Ignatova A.A., Kozlov S.A., Feofanov A.V., Grishin E.V. Spider toxins comprising disulfide-rich and linear amphipathic domains: a new class of molecules identified in the lynx spider *Oxyopestakobius*. FEBS J. 2013 Dec; 280(23):6247-61.

1.13. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИНКЕРНОГО ГИСТОНА H1 С НЕГИСТОНОВЫМ БЕЛКОМ HMGB1 ГИДРОДИНАМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Созонова А.А.¹, Чихиряева Е.В.², Поляничко А.М.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Электронный адрес: beliaeva.aleksandra@gmail.ru

Значимую роль в образовании нуклеосомной и пост-нуклеосомной структур хроматина играют такие архитектурные белки как линкерный гистоновый белок H1 и белки группы HMGB. ДНК-связывающие этих белков изучаются на протяжении долгого времени, однако до сих пор взаимодействие ДНК с линкерными белками на входе и выходе нуклеосомы остается мало изученным.

В данной работе исследовали взаимодействие белков H1 и HMGB1 методами аналитического ультрацентрифугирования и гель-электрофореза. При помощи электрофореза смеси белков в нативных условиях было установлено прямое взаимодействие между молекулами H1 и HMGB1. Показано, что взаимодействие имеет электростатическую природу и образование комплексов сильно зависит от pH среды. Образующиеся комплексы были исследованы методом аналитического ультрацентрифугирования. В работе определены коэффициенты седиментации для белков H1, HMGB1 и комплекса H1/HMGB1.

Исследования выполнены с использованием оборудования ресурсного центра "Диагностика функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники", "Развитие молекулярных и клеточных технологий" Санкт-Петербургского государственного университета.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 12-08-01134) и Правительства Санкт-Петербурга.

1.14. ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛЬБЕБЕТИНА ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА ЕГО АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛАХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Турчина А.И.¹, Ильина Н.Б.¹, Черткова Р.В.², Долгих Д.А.², Бычкова В.Е.¹, Балобанов В.А.¹

¹ Институт белка РАН, Пущино

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

Электронный адрес: alena.turcha@gmail.com

Создание гибридных конструкций, состоящих из активной и иммобилизующей частей, может найти широкое применение для конструирования новых биоматериалов. В качестве иммобилизующей части удобно использовать объекты, формирующие амилоидные фибриллы, потому что процессом образования подобных агрегатов можно управлять различными способами. Особенно важно, чтобы активная часть гибрида не встраивалась в остов фибриллы и сохраняла свою функциональную активность. В роли иммобилизатора можно использовать искусственный белок альбегетин, так как хорошо исследованы условия, в которых он в чистом виде формирует амилоидные фибриллы.

В данной работе проведено исследование амилоидообразования гибридным белком, состоящим из тиоредоксина и альбегетина, которые соединены линкером. Изначально такую конструкцию использовали, чтобы увеличить уровень экспрессии альбегетина, но в ходе проведения экспериментов выяснили, что такой гибридный белок тоже может формировать амилоидные агрегаты, как и свободный альбегетин. За появлением кросс- β структуры следили по возрастанию интенсивности флуоресценции красителя тиофлавина Т, скорость роста агрегатов оценивалась по рассеянию света, а изменения в структуре тиоредоксина тестировались методом триптофановой флуоресценции. Было показано, что в ходе инкубации при температуре 45°C при pH 6.5 происходит рост амилоидных агрегатов. Тиоредоксин занимает значительную часть гибридной молекулы (14 кДа из 27 кДа, альбегетин только 7 кДа), следовательно, он вносит большой вклад в изменение вторичной структуры гибридной молекулы. Спектры КД в дальней УФ-области показали, что изменения вторичной структуры в процессе образования амилоидов незначительны. Из этого следует, что тиоредоксин не перестраивается для образования амилоидов. Это подтверждается неизменностью положения пика триптофановой флуоресценции. Исходя из вышеописанного, можно предположить, что тиоредоксин не участвует в формировании остова амилоидной фибриллы. Таким образом, альбегетин может являться потенциальным объектом для иммобилизации на нем ферментов.

Работа выполнена при поддержке программы "Молекулярная и клеточная биология" РАН.

1.15. ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ИЗОФОРМ АЛЛЕРГЕНА ЧЕЧЕВИЦЫ *Len c 3*

Финкина Е.И., Богданов И.В., Стукачева Е.А., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В.

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

Липид-транспортующие белки (ЛТР) составляют один из классов растительных белков, участвующих в защите растений от воздействия разнообразных стрессовых факторов окружающей среды, включая атаку фитопатогенных микроорганизмов. Структура данных белков стабилизирована четырьмя дисульфидными связями и характеризуется высокой устойчивостью. Растительные ЛТР являются паналлергенами, участвующими в развитии перекрестных аллергических реакций на различные растительные продукты и пыльцу. Различные изоформы ЛТР растений, как правило, характеризуются различной иммунореактивностью и представляют интерес как основа для создания гипоаллергенных вариантов основных аллергенов для проведения аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ).

Ранее нами из семян чечевицы *Lens culinaris* был выделен и охарактеризован липид-транспортующий белок Lc-LTP2, который был зарегистрирован в базе данных аллергенов IUIS под аббревиатурой *Len c 3*. Данная работа посвящена разработке биотехнологического способа получения и исследованию структурно-функциональных и иммунологических свойств двух других изоформ ЛТР чечевицы.

Рекомбинантные Lc-LTP1 и Lc-LTP3, являющиеся изоформами аллергена чечевицы *Len c 3*, были получены путем проведения гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli*. Было показано, что данные белки имеют в основном α -спиральную структуру и характеризуются способностью связывать жирные кислоты. Также было показано, что рекомбинантные Lc-LTP1 и Lc-LTP3 обладают противогрибковой и умеренной антибактериальной активностями, но не характеризуются выраженной специфичностью антимикробного действия. Было продемонстрировано, что Lc-LTP1 и Lc-LTP3 обладают способностью связывать специфические IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией на бобовые, фрукты и орехи, однако иммунореактивность данных изоформ ниже, чем у *Len c 3*. Также было показано, что исследуемые изоформы так же, как и *Len c 3*, перекрестно реагируют с основным аллергеном персика Pru p 3. Таким образом, было установлено сходство структурно-функциональных и иммунологических свойств рекомбинантных Lc-LTP1 и Lc-LTP3 и других аллергенных ЛТР.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 13-08-00956).

1.16. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛОВ ДЛЯ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПОЛУЧЕНИЯ ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЛКОВОЙ И УГЛЕВОДНОЙ ПРИРОДЫ ИЗ СОЕВОЙ МУКИ

Хабибулина Н.В., Красноштанова А.А., Полтева Е.Д., Кареткин Б.А.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва
Электронный адрес: ernestine2007@ya.ru

Состав соевой муки (около 50% белка и 35% углеводов) позволяет рассматривать её как ценное сырьё для получения гидролизатов белковой и углеводной природы. Белковые гидролизаты находят применение в пищевой промышленности в качестве функциональных агентов, входят в состав специального питания для детей. Частичный гидролиз углеводов в составе соевой муки позволяет, с одной стороны, повысить питательную ценность продукта при его использовании в кормах животных, с другой - получать жидкие полупродукты с высоким содержанием редуцирующих веществ, которые могут быть использованы в микробиологической промышленности. Наиболее современным подходом к получению гидролизатов является использование ферментных препаратов. Являясь катализаторами биологического происхождения, ферменты способны менять активность под действием различных веществ, например, алкилоксибензолов (АОБ) - факторов роста микроорганизмов.

В настоящей работе сырьем для получения гидролизатов служила предварительно обработанная экструзией соевая мука, в качестве ферментных препаратов использовали трипсин (для получения белковых гидролизатов) и целловиридин (для расщепления углеводной составляющей муки). Подобраны оптимальные концентрации обоих ферментов, а также субстрата, обеспечивающие максимальную полноту гидролиза. Было изучено влияние на ферментализацию соевой муки трипсином и целловиридином таких параметров, как концентрация АОБ-С7, продолжительность предварительной инкубации АОБ с раствором ферментного препарата, а также влияние внесения АОБ на температурный и pH-оптимумы ферментных препаратов. Показано, что для обоих ферментов оптимальной концентрацией АОБ-С7 является 10^{-4} - 10^{-5} моль/л, при этом гидролиз протекает на 15-20% эффективнее. Для трипсина при продолжительности прединкубации менее 5 минут эффективность гидролиза снижается, при продолжительности 10 и более минут - повышается, для целловиридина наилучшие результаты получены при времени прединкубации 0-10 мин. Значение температурного оптимума и оптимума pH при использовании АОБ-С7 не изменяются.

Настоящая работа подготовлена по результатам исследований, проведенных в рамках гранта Президента РФ для поддержки молодых российских ученых МК-4800.2014.4.

1.17. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРУ ЭНДОЛИЗИНА БАКТЕРИОФАГА T5

Шаврина М.С.^{1,2}, Молочков Н.В.³, Зимин А.А.⁴, Микулинская Г.В.^{1,2}

¹ Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

² Филиал Института биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино

⁴ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушкино

Электронный адрес: maria_shavrina@inbox.ru

Ферменты занимают особую нишу в практической деятельности человека, множество сфер экономики используют их в своих процессах. Широкое применение ферменты находят в медицине, микробиологической и фармацевтической промышленности. Эндолизин, как одна из групп литических ферментов, в силу своей специфичности к пептидогликану бактерий и наличия определенного, часто весьма узкого, спектра антибактериальной активности, представляют собой возможную альтернативу антибиотикам, что делает их перспективными для исследований.

Эндолизин бактериофага T5 (Endo T5) - пептидогликанлизирующий фермент, специфичный к муреину грамотрицательных бактерий. Это - металлозависимая цинксодержащая L,D-пептидаза семейства M15. Мы исследовали влияние различных факторов на активность фермента, в частности, активацию и ингибирование двухвалентными катионами, влияние температуры, действие металлохелаторов.

Исследование температурной чувствительности Endo T5 показало, что эндолизин является термостабильным белком, так как сохраняет более 65% активности после 30-минутного прогрева при 90°C. Методом кругового дихроизма (КД) в области дальнего ультрафиолета (250-190 нм) контролировали изменения вторичной структуры белка. При прогреве до 40-90°C наблюдалось постепенное уменьшение доли α -спиральных участков с 21.5 до 8.1%. Последующее охлаждение образца приводило к практически полной ренатурации вторичной структуры белка.

Эксперименты с хелаторами с различной избирательностью к катионам показали, что хелаторы широкого спектра действия (EDTA, EGTA) и хелатор с высоким сродством к кальцию - ВАРТА - в концентрации 1 мМ полностью ингибируют активность фермента. Интересно, что специфичный к ионам цинка 1,10-фенантролин не является ингибитором, так же как и ингибитор сериновых протеаз RMSF, взятый в качестве контроля. Очевидно, они не влияют на активный центр эндолизина и обеспечивают сохранение 94 и 74% активности, соответственно.

Двухвалентные катионы Ca^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} в концентрации 0.05 - 0.1 мМ активируют фермент, однако добавленный извне Zn^{2+} является эффективным ингибитором даже в концентрации 0.2 мМ. Предполагается, что при активации механизм связывания $Ca^{2+}/Mg^{2+}/Mn^{2+}$ отличен от механизма связывания цинка в активном центре фермента.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ № 13-04-00991-а.

СЕКЦИЯ 2

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

2.1. ОСОБЕННОСТИ ЭВОЛЮЦИИ 3'-UTR ДЛЯ ГЕНА *Dras1* У ДРОЗОФИЛ ГРУППЫ *VIRILIS* И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИ УДАЛЕННЫХ ВИДОВ

Барсуков М.И.¹, Сивопляс Е.А.¹, Кутузова Н.М.¹, Прошаков П.А.², Чекунова А.И.², Куликов А.М.², Митрофанов В.Г.²

¹ Московский педагогический государственный университет (МПГУ), Москва

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

Электронный адрес: biochem_mpgu@mail.ru

Ген *ras1* - это протоонкоген, который участвует в передаче сигнала от рецепторных тирозинкиназ к транскрипционным факторам, регулирующим клеточный цикл, контролируя, таким образом, пролиферативную функцию клетки. Ранее нами была изучена изменчивость последовательностей всех структурных элементов гена *ras1*, включая 3 экзона, 3 интрона, предпромоторную область и 5'-нетранслируемый район (5'-UTR) в группе близкородственных видов дрозофил *virilis*. В данной работе мы исследовали изменчивость 3'-нетранслируемого района (3'-UTR) данного гена длиной 1500 п.о. у дрозофил разной степени филогенетической близости. В работе использовались нуклеотидные последовательности 3'-нетранслируемого района гена *ras1*, взятые из базы данных FlyBase (*D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. melanogaster*, *D. erecta*, *D. yakuba*, *D. sechellia*, *D. simulans*, *D. ananassae*, *D. mojavensis*, *D. grimshawi*, *D. willistoni*), и изосамочные линии дрозофил группы *virilis*: *D. virilis*, *D. americana americana*, *D. a. texana*, *D. lummei*, *D. ezoana*, *D. kanekoi*, *D. laticicola*, *D. montana* из коллекции лаборатории генетики Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Для компьютерной обработки данных применялось программное обеспечение LaserGene и MEGA 6.06.

Среди вариабельных замен в 3' - нетранслируемом районе дрозофил группы *virilis* часто встречаются конвергентные замены в одном сайте (гомоплазия). Обнаружены новые видоспецифические замены - для вида *D. virilis*. Выявлены полиморфные сайты, из которых 15 являются филогенетически информативными. Интерес представляют также I/D (insertion/deletion) полиморфизмы (от 4 п.н.) дрозофилы *virilis* и филогенетически удаленных видов. При сравнении 3'-UTR выявлены множественные I/D (более 80) в областях микросателлитных повторов (2-3 п.н.), а также не менее 5 фрагментов мобильных элементов, по всей видимости, в разное время принимавших участие в формировании 3'- некодирующих областей.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-00926 и Программой Президиума РАН "Живая природа".

2.2. ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДИХЛОРОДИАММИНПЛАТИНЫ(II) С ДНК И БЕЛКАМИ ХРОМАТИНА

Белая И.А.¹, Чихиржина Е.В.², Поляничко А.М.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Электронный адрес: belaya.irina.2211@gmail.com

В настоящее время известно, что основной мишенью противоопухолевых платиновых препаратов, в том числе и *цис*-диамминдихлорплатины (*цис*-ДДП), является ДНК. Основную часть всех повреждений ДНК составляют внутринитевые сшивки *цис*-ДДП с атомами N7 соседних пуриновых оснований. Именно благодаря этим сшивкам *цис*-ДДП обладает противоопухолевой активностью, в отличие от *транс*-ДДП, которая не способна образовывать сшивки такого типа. На биологическую активность ДДП также могут влиять и другие биомолекулы. В частности, негистоновый белок HMGB1 специфически связывается с поврежденными участками ДНК.

В работе были исследованы комплексы *цис*-ДДП и *транс*-ДДП с ДНК и с хромосомными белками спектроскопическими методами в ИК- и УФ-диапазоне, а также с помощью гель-ретардации. Комплексы измерялись при молярных соотношениях платины к фосфатам ДНК в диапазоне от 0 до 0.1. В спектрах кругового дихроизма комплексов ДДП с ДНК в области 280 нм наблюдаются увеличение интенсивности КД и смещение максимума соответствующей полосы в длинноволновую область. Помимо этого наблюдается увеличение интенсивности отрицательной полосы КД с минимумом в области 210 нм. Были измерены ИК спектры поглощения комплексов ДДП с ДНК и белками в растворах H₂O и D₂O. Наиболее существенные изменения в спектрах поглощения ДНК наблюдались в полосе, соответствующей колебаниям C=N7 гуанина и аденина.

Часть работ выполнена на оборудовании ресурсного центра СПбГУ "Оптические и лазерные методы исследования вещества".

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант №12-08-01134.

2.3. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСНОВ СОЦИАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ГЕНОВ СЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫХ ЛИНИЙ ЛИС

Киргизова В.И.^{1,2}, Андреева Т.В.^{1,2}, Генаев М.А.², Брагин А.О.², Григоренко А.П.^{1,2,3}, Гусев Ф.Е.^{1,2}, Гунбин К.В.¹, Деменков П.С.², Афонников Д.А.², Гольцов А.Ю.¹, Ершов Н.И.², Колчанов Н.А.², Розаев Е.И.^{1,2,3}

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

² Центр нейробиологии и нейрогенетики мозга, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Department of Psychiatry, Brudnick Neuropsychiatric Research Institute, University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA

Электронный адрес: Vitalina.kirgizova@gmail.com

Линии серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes*), селекционированные на базе Института цитологии и генетики СО РАН в Новосибирске на протяжении 50 поколений на дружелюбное или агрессивно-враждебное поведение по отношению к человеку, являются уникальной моделью для изучения процессов доместикации и механизмов формирования различных типов социального поведения. С использованием платформы Illumina HiSeq2000 получены представительные библиотеки геномной ДНК клеток крови и мозга, и проведено глубокое секвенирование полных геномов с высоким покрытием ручной, агрессивной, неселектированной лис и лис дикого типа. Проведено аннотирование белок-кодирующих генов и отобраны гены-кандидаты с генетическими вариациями, по которым различаются ручные и агрессивные линии лисиц и которые затем были подтверждены стандартным методом секвенирования по Сэнгеру на расширенной выборке. Выявленные нами мутации, специфичные только для агрессивных или ручных лисиц позволяют предположить сигнальные пути, вовлеченные в "эволюцию" социального поведения.

2.4. РАСЧЕТ ЭЛЕКТРОННЫХ СПЕКТРОВ ВОЗБУЖДЕНИЯ НЕКАНОНИЧЕСКИХ КОНФОРМАЦИЙ ДИМЕРОВ ПИРИМИДИНОВЫХ АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Максимов Д.А., Рамазанов Р.Р., Кононов А.И.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
Электронный адрес: da.maksimov.da@gmail.com

Спектр поглощения нуклеиновых кислот (НК), находящихся в канонических В- или А- формах, практически не перекрывается со спектром солнечного излучения вблизи поверхности Земли, однако считается, что взаимодействие НК с УФ-излучением солнечного спектра является главной причиной возникновения фотохимических повреждений в НК, вызывающих онкологические заболевания кожи. Локальное отклонение геометрических параметров структуры димеров азотистых оснований от канонических значений может вызывать значительные изменения в их электронных состояниях, а, следовательно, и в электронных спектрах возбуждения. В данной работе представлены расчеты электронных спектров возбуждения для пиримидиновых гомодимеров, находящихся в В-форме и неканонических формах, которые были найдены в структурах, полученных из ЯМР экспериментов.

Для пиримидиновых гомодимеров методом конфигурационных взаимодействий однократно возбужденных конфигураций были рассчитаны энергии вертикальных переходов возбужденных состояний и силы осцилляторов, соответствующие данным переходам. Геометрии мономеров азотистых оснований в основном состоянии предварительно были получены путем оптимизации геометрических параметров по энергии методом Хартри-Фока с использованием корреляционных поправок Меллера-Плессе второго порядка. Был проведен анализ влияния базисных функций и взаимного расположения мономеров в димере на положения энергий возбужденных состояний. Типы переходов были визуализированы с помощью построения разностных электронных плотностей между основным и возбужденными состояниями.

В некоторых случаях наблюдается значительно большее расщепление $\pi\pi^*$ состояния, которое достигает 0.5 эВ. Такое расщепление не характерно для гомодимеров, находящихся в обычной В-форме, в которых оно находится в пределах 0.1-0.2 эВ. Смещение слабоинтенсивного $\pi\pi^*$ перехода в длинноволновую область сильно зависит от взаимного расположения мономеров азотистых оснований. В результате можно сделать вывод, что неканонические формы димеров нуклеиновых оснований в определенных условиях могут сдвигать спектр поглощения НК в красную область, делая НК хорошей мишенью для солнечного излучения вблизи поверхности Земли.

2.5. АССОЦИАЦИЯ И ФОТОПРЕВРАЩЕНИЯ ТИМИДИНА В РАСТВОРАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА

Николаев А.И., Пастон С.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет, Санкт-Петербург
Электронный адрес: teterev3000@mail.ru

Тимидин - наименее устойчивый к ультрафиолетовому (УФ) облучению нуклеотид. Большую часть фотохимических реакций в ДНК составляют процессы димеризации соседних тиминов и гидратации пиримидинов на участках с нарушенной вторичной структурой [1]. Такие изменения в структуре хромофоров приводят к значительным спектральным изменениям, особенно заметным в растворах poly-T [2]. Вероятность образования димеров в растворах тимидина зависит от степени самоассоциации его молекул и может варьировать в разных растворителях.

В работе методами УФ-спектроскопии, кругового дихроизма (КД) и масс-спектрометрии (МС) (ESI) изучали водные, водно-солевые (0-5 М NaCl) и водно-этанольные (0-84% v/v) растворы тимидина, необлученные и УФ-облученные разными дозами ($\lambda_{\text{обл}} = 264$ нм). Был определен коэффициент экстинкции тимидина в изученных растворах. Минимальное значение $\lambda(268 \text{ нм}) = 7860 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ в водно-этанольном растворе 84%, максимальное значение $\lambda(268 \text{ нм}) = 10900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ в растворе 5 М NaCl, в воде $\lambda(268 \text{ нм}) = 9560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Интенсивность положительной и отрицательной полос в спектре КД тимидина возрастает с ростом концентрации этанола. Результаты МС показывают, что в этанольном растворе агрегирование тимидина менее выражено, чем в воде. Таким образом, полярность и ионная сила растворителя оказывают значительное влияние на способность молекул тимидина к ассоциации и его спектральные свойства.

С ростом дозы УФ-облучения интенсивность поглощения тимидина при $\lambda = 268$ нм линейно снижается. Этот эффект сильнее выражен при больших концентрациях этанола и NaCl, чем в водном растворе. Данные МС показывают, что вследствие УФ-облучения в водном растворе количество димеров снижается, тогда как в спиртовом - увеличивается. Продукты гидратации тимидина в растворах не обнаружены. Можно заключить, что ассоциация, фотоувствительность и состав фотопродуктов тимидина существенно зависят от полярности и ионной силы растворителя.

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ "Методы анализа состава вещества".

Литература

1. T. Douki, M. Court, J. Cadet // J. Photochem. Photobiol. B: Biol., vol. 54 (2000), 145-154.
2. W. Mu, D. Zhang, L. Xu, Zh. Luo, Yu. Wang // Biochem. Biophys. Methods, vol. 63 (2005) 111-124.

2.6. TRAR (tRNA-ASSOCIATED REPEATS) – КОРОТКИЕ ПОВТОРЫ ДНК С НЕИЗВЕСТНОЙ ФУНКЦИЕЙ

Новолаев Т.И., Остерман И.А.

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

Электронный адрес: timofei_novolaev@mail.ru

Транспортные РНК служат ключевым элементом в биосинтезе белка, являясь своеобразным адаптером, доставляющим аминокислоты к месту синтеза белка. В бактериальном геноме гены тРНК организованы в опероны. Эти опероны, помимо самих генов тРНК, содержат такие элементы, как TRAR'ы (от англ. *tRNA-associated repeats*). TRAR'ы - это короткие 18-ти нуклеотидные повторы с последовательностью нуклеотидов, схожей с 3'-концом соответствующего гена тРНК, за которым они расположены. Несмотря на то, что эти повторы изучаются уже достаточно давно, до сих пор нет точной информации об их функциональном назначении в геноме. Только для оперона, кодирующего тирозиную тРНК, показано, что эти повторы могут экспрессироваться, в то время как для остальных оперонов такой информации нет.

В нашей работе мы пытаемся выяснить функциональную роль этих генетических элементов. С помощью двумерного белкового гель-электрофореза мы обнаружили, что в зависимости от наличия или отсутствия TRAR'ов в геноме наблюдается разный уровень экспрессии белка *agn43*. *Agn43* - это мембранный белок, расположенный на внешней стороне бактериальной мембраны и отвечающий за автоагрегацию клеток. В свою очередь, экспрессия *agn43* регулируется посредством конкурентного связывания двух белков: *dam*-метиلاзы и *oxyR*. *Dam*-метилаза метилирует аденин в последовательности 5'-GATC-3', которая расположена в регуляторном участке гена *agn43*. Этот же участок является сайтом связывания *oxyR*. Когда 5'-GATC-3' не метилирован, *oxyR* может свободно связываться с этим участком, таким образом подавляя экспрессию *agn43*. Однако, если данная последовательность будет метилирована, то *oxyR* теряет аффинность к этому участку, что приводит к экспрессии *agn43*. Для того чтобы понять, как наличие TRAR'ов может влиять на уровень экспрессии *agn43*, мы сделали репортерную конструкцию, в которой промотор репортерного белка был заменен на промотор *agn43*. С другой стороны, мы использовали метод ПЦР в реальном времени для оценки уровня представленности транскриптов как *agn43*, так и его регуляторов - *oxyR* и *dam*. Также мы оценили общее влияние TRAR'ов на работу *dam*-метилазы и, как следствие, на уровень метилирования ДНК.

2.7. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ОКСИТОЦИНОВОГО РЕЦЕПТОРА (OXTR, rs53576) У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ АФРИКАНСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ ХАДЗА И ДАТОГА

Петросян Н.С.^{1,2}, Суходольская Е.М.¹, Кутузова Н.М.², Бутовская М.Л.³, Васильев В.А.¹

¹ Институт биологии гена РАН, Москва

² Московский педагогический государственный университет, Москва

³ Институт этнологии и антропологии им. Н.Н. Миклухо-Маклая РАН, Москва

Электронный адрес: gunnar.rus@gmail.com

Гормон окситоцин оказывает влияние на функционирование нервной системы. Регуляция гормона окситоцина в организме человека осуществляется генами окситоцина (*OXT*) и окситоцинового рецептора (*OXTR*). Показано, что у человека гены окситоциновой системы связаны с привязанностью родителей к потомкам, чувствами романтической любви и доверия, эмпатией и щедростью к незнакомцам. Целью данной работы явилось изучение генетической вариабельности одного из генов окситоциновой системы - окситоцинового рецептора (*OXTR*, rs53576) - в традиционных племенных обществах Танзании, характеризующихся разным уровнем культуры допустимой агрессии: хадза (эгалитарные охотники-собиратели) и датога (военизированные полуседлые скотоводы). Исследование ДНК хадза (197 мужчин и 158 женщин) и датога (231 мужчины и 233 женщины) проводилось методом ПЦР с локус-специфичными праймерами с последующей обработкой продуктов амплификации эндонуклеазой рестрикции *VamHI*. Исследование популяций показало, что у датога наблюдается тенденция к увеличению частоты аллеля G (0,69 - датога, 0,61 - хадза) и снижению частоты аллеля A (0,31 и 0,39, соответственно). Сравнение частот генотипов показало, что у представителей датога чаще встречается гомозиготный генотип G/G (0,47 - датога, 0,33 - хадза). Разница в частоте гетерозигот G/A (0,45 - датога, 0,55 - хадза) и гомозигот A/A (0,08 и 0,12, соответственно) в популяциях незначительна. Согласно результатам теста на соответствие равновесию Харди-Вайнберга, обе популяции находятся в состоянии равновесия. При разделении популяций по гендерному признаку было показано, что мужская часть популяций значительно отличается по распределению частот гомозиготного генотипа G/G (0,54 - датога, 0,34 - хадза) и гетерозиготного генотипа G/A (0,38 и 0,56, соответственно), однако разница в частоте гомозигот A/A незначительна (0,09 и 0,10, соответственно). В распределении частот аллелей у мужчин датога сохраняется такая же тенденция, как в популяции. Сравнение частот аллелей и генотипов женской части популяций не выявило значительных различий между популяциями. Выяснение возможных связей аллельных вариантов данного локуса с учетом гендерных особенностей с различными формами социального поведения является предметом нашей дальнейшей работы.

2.8. ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ТОЧКИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНА *Dras1* У ДРОЗОФИЛ ГРУППЫ *VIRILIS* И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИ УДАЛЕННЫХ ВИДОВ

Сивопляс Е.А.¹, Барсуков М.И.², Чекунова А.И.², Прошаков П.А.², Кутузова Н.М.¹, Куликов А.М.²

¹ Московский педагогический государственный университет (МПГУ), Москва

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва
Электронный адрес: sivorplyas-ekater@mail.ru

Реализация генетической информации, содержащейся в клетке, осуществляется путем транскрипции. Регуляция транскрипции - сложный процесс, осуществляемый наборами мультимерных комплексов и опосредующий влияние внешних стимулов на экспрессию генов. Ген *Dras1* кодирует белок Ras1, который относится к семейству малых ГТФаз, участвующих в регуляции клеточной пролиферации. Мутации в этом гене часто приводят к канцерогенезу. Промотор гена *Dras1* для подрода *Sophophora* группы *melanogaster* (*D.melanogaster*, *D.erecta*, *D.yakuba*, *D.sechellia*, *D.simulans*) имеет одинаковую последовательность TGCCAGCTCTAGTATCTTC, только у *D.yakuba* в 8 положении произошла замена Т на А. Промотор гена *Dras1* для подрода *Sophophora* группы *pseudoobscura* (*D.pseudoobscura* и *D.persimilis*) имеет отличающуюся последовательность АТАГТГCTGA, но он не изменил свое местоположение в гене. Для определения точки инициации транскрипции (TSS) гена *Dras1* у видов *Drosophila* группы *virilis* была проведена быстрая амплификация 5'-концевых фрагментов кДНК (5'-RACE) с помощью набора реагентов STEP-OutRACE (Евроген, Россия). В эксперименте использованы близкородственные виды *Drosophila* группы *virilis* (*D.virilis*, *D.americana americana*, *D.a.texana*, *D.lummei*, *D.ezoana*, *D.kanekoi*, *D.lacicola*, *D.montana*) из коллекции лаборатории генетики Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. В результате для дрозофил группы *virilis* был определен другой промотор AACACTTACAAAATACGGCAATATAAAAAA. Полученные данные совпадают с расчетной точкой старта транскрипции. Произошло изменение промотора консервативного гена *Dras1*, функции и экспрессия которого тканеспецифичны и обладают постоянством.

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-00926 и Программой Президиума РАН "Живая природа".

2.9. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СЕРТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ (5-HTTL, 5-HT1A, 5-HT2A И MAOA) КАК ИНДИКАТОР УСПЕШНОСТИ У СПОРТСМЕНОВ СИЛОВЫХ ВИДОВ СПОРТА

Фехретдинова Д.И.^{1,2}, Кутузова Н.М.², Бутовская П.Р.³

¹ Институт биологии гена РАН, Москва

² Московский педагогический государственный университет, Москва

³ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва
Электронный адрес: fekhretdinovadaniya@gmail.com

Достижение высоких результатов в спорте невозможно без сочетания целого ряда средовых и индивидуальных факторов, которые включают в себя генетическую предрасположенность спортсмена к занятию конкретным видом спорта. Цель данной работы - изучение вариативности четырех генов серотониновой системы (5-HTTL, 5-HT1A, 5-HT2A и MAOA), ассоциированных с поведением, и, предположительно, с успешностью в спорте у борцов греко-римского стиля, дзюдо и самбо (n=106) по сравнению с контрольной группой (n=163) (студенты, не занимающиеся спортом профессионально). В ходе работы было установлено распределение частот аллелей и генотипов в этих двух выборках. Показана более высокая частота генотипа SS (p=0.04) локуса 5-HTTLPR у спортсменов. Также между этими выборками выявлена тенденция к различию частоты распределения объединенных генотипов по локусу 5HTTLPR (VNTR + SNP rs25531) с преобладанием у спортсменов генотипа SaSa (p=0.06). Не обнаружено достоверных различий у мужчин в исследуемых выборках по частоте распределения аллелей генов 5HT1A (rs6295) p=0.42, 5HT2A (rs6311) p=0.31 и MAOA (VNTR) p=0,81. С помощью опросника NEO версия PI-R проведен анализ возможных корреляций между генотипами и психологическими особенностями личности в исследуемых выборках. Показано, что спортивные достижения у спортсменов борцов ассоциированы с меньшей открытостью опыту и большей добросовестностью. Выявлена тенденция влияния взаимодействий факторов пол × ген 5HT2A на самооценку по открытости опыту, а также взаимодействий факторов: уровень спортивных достижений × ген 5HT2A, пол × ген 5HT1A на самооценку добросовестности.

Следует отметить, что успешность в силовых видах спорта не была достоверно связана ни с одним из представленных в нашей работе полиморфизмов генов серотониновой системы. Вместе с тем, по-видимому, вклад взаимодействующих факторов пол × ген 5HT2A в самооценку по двум личностным шкалам нельзя считать случайным. Возможно, дальнейшие исследования на новых выборках спортсменов, специализирующихся на других видах спорта, позволят внести большую ясность в этот вопрос.

2.10. ИЗУЧЕНИЕ ПЛЕНОК ДНК МЕТОДОМ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ

Шуленина О.В., Пастон С.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
Электронный адрес: leka-helga@yandex.ru

Ионы щелочных металлов и молекулы воды гидратной оболочки ДНК стабилизируют ее вторичную структуру. При относительной влажности выше 80% (в растворах и в клетках) реализуется В-форма ДНК. Понижение относительной влажности ведет к переходу В-А или В-С в зависимости от нуклеотидного состава ДНК [1].

Пленки ДНК в H_2O с разным содержанием NaCl ($[Na]/[P]=1.7-66$) при относительной влажности 0% получали высушиванием капли водно-солевого раствора ДНК с заданным $[Na]/[P]$ на кристалле алмазной ячейки однократного НПВО ИК-Фурье спектрометра потоком чистого сухого воздуха. По изменению ИК-спектров наблюдали динамику испарения капли. В-А переход во вторичной структуре ДНК при уменьшении влажности пленок фиксировали по характерным изменениям полос ИК-спектров [2, 3]. По мере высушивания капли образца интенсивности полос, связанных с деформационными колебаниями О-Н групп воды, уменьшались. При относительной влажности 0% эти полосы полностью исчезли. Наблюдалось изменение интенсивности и формы широкой полосы в области $3165-3400\text{ см}^{-1}$ (валентные колебания О-Н групп воды и NH_2 - и NH -групп азотистых оснований, деформационные колебания О-Н групп), вызванные уменьшением общего количества О-Н групп воды и изменением соотношения связанной и несвязанной воды в пленках. При относительной влажности 0% каждая пленка содержала только связанную воду. Опыт показал, что время полного высушивания образцов и количество связанной воды в пленках зависят от концентрации соли. Чем больше содержание NaCl в пленке, тем больше времени занимает процесс ее высушивания и тем меньше воды в ней остается. Эти данные согласуются с литературными данными об изменении гидратной оболочки ДНК при высоких концентрациях ионов металлов [4]. Снижение количества связанной воды с ростом содержания соли в пленке может быть вызвано вытеснением ионами молекул воды из ближайшего окружения ДНК.

Исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ "Методы анализа состава вещества".

Литература

1. Saenger W. Principles of nucleic acid structure. - Springer Verlag, 1984.
2. Hollas J.M. Modern spectroscopy. John Wiley & Sons, Ltd. - 2004.
3. Жижина Г.П., Олейник Э.Ф. // Успехи химии - 1972. - 41. - Вып. 3. - С.474.
4. Касьяненко Н.А., Фрисман Э.В. // Молекулярная биология - 1990. - 24. - Вып.2- С.318.

2.11. ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ТРЕХ ГЕНОВ СЕРТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ (5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT1B) У МУЖЧИН В ПОПУЛЯЦИЯХ ХАДЗА И ДАТОГА

Щербакова О.И.^{1,2}, Суходольская Е.М.¹, Бутовская М.Л.³, Вергун А.А.², Васильев В.А.¹

¹ Институт биологии гена РАН, Москва

² Московский педагогический государственный университет, Москва

³ Институт этнологии и антропологии им. Н.Н. Миклухо-Маклая РАН, Москва

Электронный адрес: shh-olja@rambler.ru

В современном мире одной из важнейших социальных проблем общества является агрессивное поведение, в связи с чем эта тема привлекает внимание все большего количества ученых. Серотонинергическая система имеет прямое отношение к формированию различных типов социального поведения. Целью данной работы являлось изучение генетической вариабельности рецепторов серотониновой системы трех генов: 5-HT1A (rs6295), 5-HT2A (rs6311), 5-HT1B (rs6296), ассоциированных с агрессивным поведением у мужчин в африканских этнопопуляциях Танзании - хадза и датого. При исследовании ДНК хадза (n=195) и датого (n=230) были выявлены достоверные различия в показателях аллельного полиморфизма двух изучаемых генов - 5-HT1A и 5-HT1B. Тест на гетерогенность локуса 5-HT1A показывает, что распределения частот генотипов высокозначимо различаются у хадза и датого (p-value = 0,000). Коэффициент фиксации ($F_{st} = 0,1816$) подтвердил очень сильную дифференциацию популяций хадза и датого по этому локусу. Проверка на гетерогенность локуса 5-HT1B выявила, что распределение частот генотипов значимо различаются у хадза и датого (p-value = 0,00368), а коэффициент фиксации ($F_{st} = 0,0175$) свидетельствует об очень слабой дифференциации исследуемых популяций по этому локусу. Достоверных различий в распределении аллелей гена 5-HT2A не было обнаружено. Анализ аллельных вариантов локуса 5-HT1A выявил, что в популяции хадза встречаемость аллеля С ($p = 0,2205$) в значительной степени меньше, чем в популяции датого ($p = 0,5304$), что было показано и при анализе генотипов. В популяции датого преобладал гетерозиготный генотип C/G ($p = 0,4869$), в отличие от популяции хадза, где преобладал гомозиготный генотип G/G ($p = 0,5897$). При сравнении генотипов локуса 5-HT1B было обнаружено преобладание гомозиготного генотипа G/G ($p = 0,5633$) в популяции датого, в то же время распределение гетерозиготных генотипов в обеих популяциях было одинаково.

Популяции хадза и датого различаются разным уровнем культурно допустимой агрессии, а выявленные различия в распределении частот определенных генотипов в популяциях могут быть ассоциированы с агрессивным поведением. Выяснение возможных связей аллельных вариантов данных локусов с различными формами агрессивного поведения является предметом нашей дальнейшей работы.

СЕКЦИЯ 3 СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ, ЛИПИДОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ

3.1. ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АЦИЛДОФАМИНОВ НА КЛЕТКИ ФЕОХРОМОЦИТОМЫ РС12

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

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

Ацилдофамины представляют собой семейство эндогенных амидных производных жирных кислот, взаимодействующих с ключевыми белками каннабиноидной и ванилоидной систем (рецепторы, гидролазы). Соединения этой группы являются важными биорегуляторами, которые обладают широким спектром действия и принимают участие во многих физиологических и биохимических процессах, таких как гормональный контроль функций организма, синаптическая, трансмембранная и внутриклеточная передача сигнала, регуляция активности ферментов. Ацилдофамины оказывают цитотоксическое действие на трансформированные клетки, однако механизм его реализации неизвестен. Целью данного исследования было определение влияния структуры жирнокислотной и дофаминовой частей молекулы ацилдофаминов на процессы клеточной гибели в клетках феохромоцитомы РС12 и определение возможных путей реализации этого эффекта с помощью ингибиторного анализа. Феохромоцитома РС12 - гормонально активная опухоль хромоаффинных клеток симпато-адреналовой системы надпочечниковой или венадпочечниковой локализации, в которой присутствуют активные системы синтеза дофамина.

Методы. Клетки растили в стандартной среде, рекомендованной АТСС. Использованы следующие соединения, синтезированные в лаборатории оксипипинов из соответствующих жирных кислот и дофамина: N-олеоилдофамин, N-арахидоноилдофамин, N-стеароилдофамин, N-докозагексаеноилдофамин, N-арахидоноил-3-О-метилдофамин, N-арахидоноилнорадреналин, N-арахидоноилтирамин в концентрациях от 1,5625 до 100 мкМ. Вещества добавляли в виде раствора в ДМСО, к среде, используемой для культивирования клеток (конечная концентрация ДМСО не превышала 0.5%) и инкубировали 20 часов. После этого проводили оценку пролиферации и гибели клеток с помощью МТТ- и LDH-тестов.

Результаты. Определены полумлетальные дозы используемых веществ в двух видах тестов в диапазоне концентраций от 4 до 65 мкМ. Для производных ацилдофаминов значения полумлетальных доз, полученные в LDH-тесте, превышали значения, полученные в МТТ-тесте. Возможное объяснение этих различий заключается в том, что данные вещества оказывают двухфазный эффект на клетки: в более низких концентрациях происходит остановка пролиферации, а повышение концентрации ацилдофаминов приводит к гибели

клеток. Так, для N-арахидоноилнорадреналина значение LD₅₀ в МТТ тесте составило 4±2 мкМ, а в LDH тесте 8±3 мкМ, для N-арахидоноил-3-О-метилдофамина 55±4 и 65±2 мкМ, соответственно. В то же время для N-докозагексаеноилдофамина в обоих тестах значение LD₅₀ было 4±2 мкМ.

Для выяснения механизма цитотоксического действия ацилдофаминов был проведен ингибиторный анализ с использованием ингибиторов каннабиноидных рецепторов 1 и 2 типов, ванилоидного, дофаминового рецепторов, PPAR-гамма, катехоламиновых транспортеров и регуляторов окислительного метаболизма: перекись водорода, аскорбат и N-ацетил-L-цистеин. Из используемых ингибиторов защитное действие оказывали аскорбат и N-ацетил-L-цистеин (ингибирование эффекта N-олеоилдофамина на 82±8% и 100±3%, N-арахидоноилдофамина на 63±3% и 99±3%, соответственно).

Выводы. Для проявления ацилдофаминами цитотоксического действия на клетки РС12 критическим элементом молекулы является незамещенная катехольная группа. В то же время структура остатка жирной кислоты в диапазоне С16-С22 оказывает незначительное влияние. Одним из механизмов цитотоксического действия ацилдофаминов может быть их вмешательство в системы окислительного метаболизма клетки.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 14-04-00110-а.

3.2. ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТАВА ГЛИКОПОЛИМЕРОВ ПОВЕРХНОСТИ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Sp7 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

Евстигнеева С.С., Сигида Е.Н., Федоненко Ю.П., Игнатов В.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

Электронный адрес: Stels20295@yandex.ru

В условиях хлоридного засоления почвы обитающие в ней микроорганизмы вынуждены вырабатывать адаптационные механизмы, позволяющие противостоять повышенному осмотическому давлению почвенного раствора. Ассоциативные ризобактерии рода *Azospirillum* являются перспективными фитостимуляторами за счет продукции фитогормонов и фиксации атмосферного азота, в том числе при стрессовых воздействиях. Для этих бактерий достаточно подробно изучены механизмы синтеза различных осмопротекторов. Выявлено, что в процессе адаптации к солевому стрессу у *Azospirillum brasilense* Sp7 происходит индукция ряда генов, контролирующих синтез компонентов клеточной поверхности. Целью данной работы был анализ изменений химического состава липополисахарид-белкового комплекса (ЛПБК) капсулы *A. brasilense* Sp7 в условиях солевого стресса.

Бактерии культивировали при 30°C до окончания экспоненциальной фазы роста в жидкой селективной синтетической среде, содержащей 2 мМ хлорида натрия в контрольном образце и 250 мМ в исследуемом. Данная концентрация была выбрана по результатам проведенного нами скрининга в диапазоне концентраций 20-300 мМ NaCl, продемонстрировавшего изменение электрофоретического профиля белковых компонентов мембран. Капсульный материал смывали с поверхности бактерий при механическом перемешивании в 0,15 М растворе NaCl в течение трех суток с ежедневной сменой отмывающего раствора, подвергали диализу и лиофилизации.

Предварительные данные о составе моносахаридов и жирных кислот гликополимеров капсулы были получены методом ГЖХ. Моносахаридный анализ показал наличие рамнозы, фукозы, галактозы, глюкозамина, ксилозы и глюкозы в исследуемом и контрольном препаратах, однако их соотношение было различным. В условиях солевого стресса наблюдалось значительное увеличение доли глюкозы (~20% от доли всех моносахаридов), содержание которой в контроле не превышало 5%. В составе гидрофобной составляющей ЛПБК исследуемых бактерий было выявлено снижение содержания гидроксилкановых кислот на фоне увеличения доли непредельных жирных кислот.

На основании полученных данных можно предположить, что в ответ на повышение концентрации хлорида натрия в среде у бактерий *A. brasilense* Sp7 происходит экскреция в капсулу дополнительного полимера.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-01658.

СЕКЦИЯ 4 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ АКТИВНЫХ ГРУПП БИОПОЛИМЕРОВ КЛЕТОЧНЫХ СТенок ПИВОВАРЕННЫХ ДРОЖЖЕЙ МЕТОДОМ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ

Аронбаев С.Д.

Самаркандский государственный университет им. А. Навои, Самарканд, Узбекистан

Электронный адрес: diron51@mail.ru

Потенциометрическое титрование, благодаря простоте и информативности метода, широко используется для исследования равновесий в водных и безводных средах, позволяет рассчитать концентрацию и константы ионизации функциональных активных групп (ФАГ) полимеров. Целью настоящего исследования является определение ФАГ биополимеров клеточных стенок пивоваренных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, участвующих в биосорбции ионов тяжелых металлов и установление их констант ионизации.

В работе использовали осадочные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, штамм W-37, полученные после фильтрации основного продукта - пива. Биомассу центрифугировали при 5000 об/мин, осадок дрожжей отмывали дистиллированной водой, автоклавировали при 130°C в течение 1,5 ч. и высушивали в вакуумном шкафу при 65°C. Высушенную биомассу измельчали до размеров частиц 0,3-0,5 мм.

Для получения H⁺-формы биосорбента мы проводили протонирование биомассы обработкой 1 г биомассы 50 мл 0,1н. HCl в течение 3 ч. при комнатной температуре и встряхивании колб с суспензией на шейкере с частотой 150 качаний/мин. Затем проводили потенциометрическое титрование содержимого колбы 0,1н. NaOH.

Из дифференциальных кривых титрования, выражающих зависимость величины pH от количества добавленной щелочи, можно сделать качественные заключения о значении pK и количестве активных групп. Нами визуализировано три ФАГ с общей концентрацией 2,9 ммоль/г, соответствующей статической емкости сорбента по H⁺-ионам. Первая из них идентифицирована как карбоксильная, вторая - фосфорильная и третья - аминогруппа. По данным титрования найдены условные константы ионизации ФАГ графическим способом и произведены расчеты по модифицированному уравнению Гендерсона-Гассельбаха

$$pK_a = pH - m \log \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

с учетом параметра m, отображающего отклонение графического изображения зависимости от расчетного. Были установлены следующие значения pK_{кон} для этих групп: pK = 5,52±0,06; pK = 6,70±0,02 и pK = 9,48±0,05, соответственно.

Полученная в рамках метода информация о константах ионизации и концентрациях ФАГ биополимеров клеточных стенок дрожжей позволяет углубить понимание механизмов биосорбции ионов тяжелых металлов, радионуклидов и других экотоксикантов.

4.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ AEDG И AEDL С ДНК В РАСТВОРЕ

Ваишукевич Е.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
Электронный адрес: Kevich01@ya.ru

Известно, что короткие пептиды, состоящие не более чем из 20 аминокислотных остатков, играют важную роль в различных физиологических процессах. В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии были получены тетрапептиды, выделенные из различных тканей млекопитающих. Было установлено, что некоторые пептиды обладают выраженной геропротекторной активностью, оказывают биостимулирующее действие.

Целью проведенного исследования являлось изучение взаимодействия коротких пептидов AEDG и AEDL с молекулой ДНК в растворах с различной концентрацией NaCl. Растворы пептидов AEDG и AEDL смешивали с готовым раствором ДНК (коммерческий препарат высокомолекулярной ДНК тимуса телят фирмы Sigma) различной концентрации. Для анализа взаимодействия пептидов с ДНК в растворе использовали методы спектрофотометрии, кругового дихроизма. Спектры поглощения и спектры кругового дихроизма регистрировали в диапазоне длин волн от 200 до 300 нм, что обусловлено наличием полосы поглощения ДНК в этой области.

Анализ спектральных данных показал, что взаимодействие пептида AEDG с ДНК в растворе 5 мМ NaCl проявлялось сразу после приготовления растворов и сохранялось спустя 7 суток при хранении растворов при 4°C. Связывание пептида AEDG с ДНК приводило к изменению спектров поглощения с выраженным гиперхромным эффектом, свидетельствовавшим о частичной дестабилизации вторичной структуры макромолекулы ДНК при образовании комплекса с пептидом. Наблюдался также сдвиг максимума полосы поглощения комплекса в длинноволновую область, что могло указывать на связывание пептида AEDG с ДНК по большой бороздке.

При изучении комплексов пептида AEDL с ДНК были получены спектры поглощения с гипохромным эффектом. В данном случае дестабилизации вторичной структуры молекулы ДНК не происходило. Можно сделать выводы, что тетрапептиды AEDG и AEDL связываются с молекулой ДНК, это взаимодействие влияет на электронную структуру азотистых оснований ДНК.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 13-03-01192А) и СПбГУ (№ 11.38.644.2013).

4.3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ С ДНК *IN VITRO*

Морозова Е.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет, кафедра молекулярной биофизики, Санкт-Петербург
Электронный адрес: morozova.kate91@gmail.com

Исследуемые пептиды AEDG, AEDL и KENW были синтезированы в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии. В экспериментальных моделях на животных и клеточных культурах установлено, что пептиды проявляют различную биологическую активность, включающую в себя снижение риска развития опухолевых заболеваний, регуляцию экспрессии генов и функциональной активности различных органов и тканей.

Растворы пептидов AEDG, AEDL и KENW смешивали с готовым раствором ДНК (коммерческий препарат фирмы Sigma) различной концентрации в 5 мМ, 0,15 М и 1 М NaCl. Для анализа взаимодействия пептидов с ДНК в растворе использовали методы спектрофотометрии, кругового дихроизма (КД), низкоградиентной вискозиметрии, динамического светорассеяния (ДСР) и двойного лучепреломления (ДЛП).

Методами УФ-спектрофотометрии и КД было показано, что пептиды взаимодействуют с молекулой ДНК в растворе 5 мМ NaCl. В растворе 0,15 М и 1 М NaCl взаимодействие проявлялось слабо. При этом в зависимости от концентраций реагентов связывание пептидов приводило к гипо- и гиперхромному эффектам в спектре поглощения ДНК, а также к изменению спектра кругового дихроизма, что было обусловлено изменением вторичной структуры ДНК в присутствии пептидов.

Для изучения влияния пептидов на третичную структуру ДНК использовали метод вискозиметрии. Связывание пептида AEDG приводило к уменьшению объема молекулярного клубка ДНК в растворе 5 мМ NaCl. Данные вискозиметрии коррелировали с результатами методов ДСР и ДЛП.

Установлено, что пептиды AEDG, AEDL и KENW взаимодействуют с нативной молекулой ДНК в растворе, оказывая влияние на вторичную и третичную структуры макромолекулы. Выбранная модель исследования ДНК-пептид в растворе в различных концентрациях NaCl позволяет изучить связывание пептидов с ДНК. Подобранный комплекс методик дает возможность в полной мере оценить эффект взаимодействия и предложить молекулярный механизм формирования комплексов.

4.4. МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОХИНОЛИНА С ДНК

Травкина В.И., Осинникова Д.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
Электронный адрес: travkinaveronika@gmail.ru

Существуют различные молекулярные механизмы биологической активности веществ. Одним из таких механизмов является взаимодействие с ДНК и нарушение ее функций.

Важными характеристиками взаимодействия подобных биологически активных соединений с ДНК являются термодинамические параметры комплексообразования, такие, как энтальпия взаимодействия (ΔH) и термодинамическая константа связывания ($K_{связ}$), а также стехиометрия связывания (n). Единственным методом, позволяющим определить все эти параметры, является метод изотермического микрокалориметрического титрования.

В настоящей работе методом микрокалориметрии исследовались синтетические алкалоиды изохинолинового ряда, являющиеся аналогами биологически активного соединения папаверина: пирролоизохинолин (соединение I) и производное изохинолина с индольным заместителем в первом положении (соединение II). Соединения синтезированы в НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека.

Термограмма соединения I свидетельствует об одном типе его связывания с ДНК. Для обработки результатов использовалась модель идентичных не взаимодействующих мест связывания. Были получены следующие параметры комплексообразования: $\Delta H = -4,2$ ккал/моль, $K_{связ} = 7,3 \cdot 10^4$ моль⁻¹, $n = 0,3$. В случае соединения II термограмма имеет более сложный вид, указывая на существование двух типов связывания этого соединения с ДНК, мономерного и димерного. В условиях эксперимента имеет место полная ассоциация лиганда при частичном насыщении макромолекулы. Это позволяет использовать безмодельный метод обработки калориметрических данных для определения энтальпии взаимодействия соединения II с молекулой ДНК при его связывании обоими способами. При связывании мономера $\Delta H_{мон.} = -4,6$ ккал/моль, при образовании связанного димера $\Delta H_{дим.} = -5,8$ ккал/моль.

В работе был использован микрокалориметр титрования Nano ITC 2G TA Instruments, находящийся в РЦ СПбГУ "Термогравиметрические и калориметрические методы исследования".

СЕКЦИЯ 5

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЗНАВАНИЯ БИОМОЛЕКУЛ И ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В КЛЕТКЕ

5.1. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГАПОНИНА В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ НА УРОВНЕ ТРАНСКРИПЦИИ

*Воробьева Е.Е., Шаронова Н.В., Литвиненко А.П., Ракитина Т.В.,
Смирнова Е.В., Липкин В.М.*

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

Ранее в нашей лаборатории был открыт и охарактеризован белок гапонин (Вонаршенко А.В. и др., 2007). Было показано, что гапонин преимущественно локализован в ядре (Богатова О.В., 2009) и его партнером является GAPDH (Ракитина Т.В. и др., 2010). Нами также было установлено, что чувствительность клеток к окислительному стрессу (ОС) прямо коррелирует с уровнем гапонина в клетке: подавление его экспрессии в клетках уменьшает их чувствительность к воздействию ОС и, напротив, повышение уровня гапонина усиливает чувствительность клеток к действию активных форм кислорода (Смирнова Е.В. и др., 2011). Последующие исследования показали, что гапонин усиливает апоптоз, вызываемый окислительным стрессом, за счет стабилизации и повышения транскрипционной активности р53.

Для дальнейшего исследования роли гапонина при различных видах стрессового воздействия и его возможного влияния на другие сигнальные каскады было решено изучить изменение транскрипции клеточных белков, активируемых при воздействии стресса, в клетках с измененным уровнем гапонина.

Полученные нами генетически-модифицированные клеточные линии с измененными уровнями экспрессии гапонина и контрольные клеточные линии были подвергнуты окислительному стрессу (добавление пероксида водорода) и генотоксическому стрессу (обработка УФ), а также депривации сыворотки и воздействию цитокинов. Методом ПЦР в реальном времени нами был исследован уровень транскрипции белков, активируемых данными видами стресса, и было показано, что гапонин влияет на широкий спектр стресс-активируемых белков на уровне транскрипции.

5.2. ФЛЮОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫЙ ЛИГАНД ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ

Кульдюшев Н.А., Беркут А.А., Кошелев С.Г., Гришин Е.В.,
Феофанов А.В., Василевский А.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: nikita.kuldushev@phystech.edu

АТФ - вездесущий внутриклеточный компонент, который также используется в качестве внеклеточного сигнального соединения при передаче нервных импульсов, например, при восприятии болевых, вкусовых, обонятельных ощущений и сокращении мышц. Ионные каналы, активируемые АТФ, называют пуринергическими рецепторами P2X. Для визуализации этих рецепторов необходимы селективные флуоресцентно-меченые лиганды. К селективным лигандам пуринергических рецепторов относятся продуцируемые пауками пуротоксины.

Ранее в нашей лаборатории из яда паука *Thomisus onustus* был выделен пептид, названный PT1-Tho, который является родственным пуротоксину 1 (PT1). PT1-Tho представляется более удобным для использования, поскольку он состоит из 31 аминокислотного остатка и содержит 3 дисульфидные связи, в отличие от PT1, который содержит 4 дисульфидные связи и состоит из 36 остатков. Так же, как и PT1, PT1-Tho является селективным блокатором рецепторов P2X₃. В бактериальной системе экспрессии был наработан рекомбинантный PT1-Tho с выходом ~4 мг из 1 л культуры *Escherichia coli*. В качестве флуоресцентной метки мы использовали 5(6)-карбокситетраметилродамин (TMR). Этот краситель отличается высокой фотостабильностью, прост в использовании и является водорастворимым. Были подобраны оптимальные условия модификации, в результате чего мы получили монопроизводное пептида с TMR, присоединенным к аминокгруппе. Специфическое связывание флуоресцентно-меченого PT1-Tho с рецептором было продемонстрировано на ооцитах *Xenopus laevis*, которые экспрессировали ген *p2x3* человека.

Получение и исследование флуоресцентно-меченых лигандов рецепторов P2X₃ является перспективным, что в результате приведет к созданию новых методов диагностики заболеваний, а также новых молекулярных инструментов для фундаментальных исследований.

5.3. СИНТЕЗ МАРКЕРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ NO-СИНТАЗНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ГЛУБИНЫМИ КУЛЬТУРАМИ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ *LENTINUS EDODES* И *GRIFOLA FRONDOSA* В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ

Лощинина Е.А., Никитина В.Е.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
Саратов
Электронный адрес: loshchinina@yandex.ru

Важнейшую роль в жизнедеятельности грибных культур играют стрессовые состояния, под влиянием которых происходит смена морфогенетических стадий. Однако механизмы передачи внутрь клетки сигналов о действии неблагоприятных факторов у грибов до сих пор исследованы крайне мало. NO-Синтазная сигнальная система относится к числу важнейших сигнальных систем, определяющих реакцию клеток организмов на внешние воздействия. Монооксид азота (NO) является одним из наиболее важных биологических медиаторов живых организмов и принимает участие во множестве физиологических и патофизиологических процессов. Роль монооксида азота и пути его биосинтеза у грибов остаются малоизученными.

Целью настоящей работы явилось исследование NO-синтазной сигнальной системы у глубинных культур ксилотрофных базидиомицетов *Lentinus edodes* и *Grifola frondosa* в условиях температурного (5°C и 50°C) и кислотного (pH 3.0 и 10.0) стрессов и при росте на обедненных средах различного состава. Мицелий и культуральную жидкость (КЖ) в динамике роста грибов проанализировали на наличие NO и цитруллина - маркеров NO-синтазной сигнальной системы. Резкое увеличение содержания NO (на порядок) в КЖ у обеих культур происходило на среде с повышенным значением pH. На среде, бедной по азоту (содержание азота в 10 раз меньше по сравнению с контрольной средой), наблюдалось повышение содержания NO в мицелии (в 2 раза у *L. edodes* и в 4 раза у *G. frondosa* через 8 сут после инокуляции), а у *L. edodes* также в КЖ (на 30% на 14 сут роста). На 21 сут содержание цитруллина у обоих видов повышалось в мицелии на 35-40% при холодовом шоке, а в КЖ - на 10-12% при щелочном стрессе и 15-20% на среде, бедной по азоту. Таким образом, у *L. edodes* и *G. frondosa* обнаружены маркерные соединения NO-синтазной сигнальной системы. Различия с контрольным вариантом опыта особенно сильно проявились в условиях щелочного стресса и на обедненной по азоту среде. Одновременное увеличение содержания NO и цитруллина на среде с повышенным значением pH и среде, бедной по азоту, указывает на вероятную активацию у *L. edodes* и *G. frondosa* NO-синтазной сигнальной системы в этих стрессовых условиях.

5.4. МЕТОД СКРИНИНГА СПЕЦИФИЧНОСТИ МУТАНТНЫХ ФОРМ $\alpha 7$ nAHP НА ОСНОВЕ КАЛЬЦИЕВОГО ИМИДЖИНГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО СЕНСОРА Case12

Спирова Е.Н., Шелухина И.В., Кудрявцев Д.С., Оджасоко Л.О., Цетлин В.И.

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

Одной из основных функций холинергической системы в ЦНС является регуляция процессов высвобождения различных нейромедиаторов и возбудимости клеток, которая осуществляется за счет активации нейрональных никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAHP). Среди nAHP широко представлен подтип $\alpha 7$, являющийся представителем гомопентамерных рецепторов семейства лиганд-управляемых ионных каналов. Дисфункцию $\alpha 7$ nAHP связывают с нейродегенеративными и психическими заболеваниями. Исследование взаимодействия nAHP с различными лигандами помогает понять механизмы связывания и сделать некоторые выводы о пространственной структуре рецептора. Классические электрофизиологические методы изучения лиганд-связывающих свойств разных форм $\alpha 7$ nAHP имеют недостатки, связанные с трудностью экспрессии рецептора в клетках эукариотических линий или ооцитах *Xenopus*, а также с быстрой десенситизацией рецептора в ходе регистрации ионных токов. Кальциевый имиджинг, основанный на использовании флуоресцентного сенсора Case12, может служить альтернативным методом изучения специфичности мутантных форм $\alpha 7$ nAHP.

$\alpha 7$ nAHP и его мутантные формы экспрессировали в клетках мышинной нейробластомы Neuro2a совместно с кальциевым сенсором Case12, а также с шапероном RIC-3, повышающим эффективность сборки рецептора в функционально-активное состояние. Для понижения уровня десенситизации и увеличения амплитуды ответа рецепторов использовался позитивный аллостерический модулятор PNU-120596. С помощью флуоресцентного микроскопа оценивались изменения интенсивности флуоресценции кальциевого сенсора в трансфицированных клетках в ответ на действие никотиновых агонистов, что позволяло судить о специфичности экспрессированных мутантных форм $\alpha 7$ nAHP.

В ходе исследования было выявлено, что параметры связывания $\alpha 7$ nAHP и мутантов Y118W, Q117T с ацетилхолином и эпибатидином согласуются с результатами, полученными при регистрации ионных токов методом пэтч-кламп. Таким образом, метод кальциевого имиджинга может использоваться для быстрого скрининга специфичности мутантных форм $\alpha 7$ nAHP.

СЕКЦИЯ 6 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТочНЫЕ ОСНОВЫ ИММУНИТЕТА

6.1. ХАРАКТЕРИСТИКА HLA-DR-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ НК-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧЕННЫХ В УСЛОВИЯХ СТИМУЛЯЦИИ IL-2 И МЕМБРАНОСВЯЗАННЫМ IL-21

Ерохина С.А.¹, Коваленко Е.И.²

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

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

Мембраносвязанный IL-21 на поверхности модифицированных клеток линии K562 в комбинации с IL-2 - перспективные компоненты среды для наращивания NK-клеток для использования в adoptивной иммунотерапии. Известно, что оба цитокина индуцируют пролиферацию NK-клеток и активацию их функциональных свойств. Ранее нами было показано, что продолжительное воздействие комбинации IL-2 и mbIL-21 приводит к значительному увеличению доли NK-клеток, экспрессирующих HLA-DR. Целью данной работы было выяснить, являются ли HLA-DR-позитивные NK-клетки особой интерлейкин-чувствительной субпопуляцией, а также охарактеризовать их функциональные свойства.

Для этой цели выделенные методом магнитной сепарации из периферических мононуклеаров здоровых доноров NK-клетки с помощью клеточного сортировщика FACSVantage разделяли на субпопуляции HLA-DR⁺, HLA-DR⁻ и CD57⁺, затем инкубировали в течение 6 дней в различных условиях: с IL-2; с фидерными клетками K562, несущими мембраносвязанный IL-21, с IL-2 и без него; с фидерными клетками K562 без mbIL-21, с IL-2 и без него. На 6-й день цитометрически определяли количество HLA-DR-позитивных NK-клеток. В другой серии экспериментов клетки после инкубации проверяли на цитотоксичность (тест на активацию каспазы 6 в клетках-мишенях линии K562) и на продукцию IFN γ (иммуоферментный анализ).

На 6-й день инкубации с IL-2 доля HLA-DR-позитивных клеток увеличивалась в субпопуляциях CD57⁺ и HLA-DR⁺ и практически не изменялась в субпопуляции HLA-DR⁻, что согласуется с литературными данными. Однако в присутствии обоих цитокинов во всех субпопуляциях была выявлена высокая доля HLA-DR⁺-клеток, причем экспрессия значительно возрастала и на тех клетках, на которых ее изначально не было (субпопуляция HLA-DR⁻). IL-2 не вызывал увеличения продукции IFN γ в CD57⁺ и HLA-DR⁻ субпопуляциях после 6 дней инкубации. HLA-DR⁺ клетки, напротив, продуцировали IFN γ в значительных количествах. Причина этого, возможно, в том, что большая часть HLA-DR⁺ клеток - клетки CD56^{bright}, которые характеризуются повышенной способностью к продукции цитокинов в ответ на стимуляцию. В присутствии обоих цитокинов и в CD57⁺, и в HLA-DR⁻ субпопуляциях количество

продуцируемого IFN γ возрастало по сравнению с клетками, стимулированными только IL-2. Цитотоксичность CD57⁺-субпопуляции NK-клеток увеличивалась только в присутствии комбинации цитокинов. В то же время и HLA-DR⁺, и HLA-DR⁻ клетки реагировали на присутствие только IL-2 ростом цитотоксичности.

Таким образом, под действием IL-2 в субпопуляции HLA-DR⁺ NK-клеток повышается не только продукция IFN γ , но и цитотоксичность, что делает ее перспективной для использования в адоптивной терапии. Кроме того, мы выяснили, что упомянутые интерлейкины стимулируют не только пролиферацию чувствительной HLA-DR⁺ субпопуляции, но и экспрессию молекулы HLA-DR на поверхности NK-клеток *de novo* в процессе активации.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 14-04-01842).

6.2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ВИРУСА ЯЩУРА, КОНЬЮГИРОВАННОГО С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА, ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНАЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Меженный П.В., Фомин А.С., Щеголев С.Ю., Дыкман Л.А., Староверов С.А.

¹ Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

Электронный адрес: dykman@ibppm.sgu.ru

Ящур - острое высоко контагиозное инфекционное заболевание домашних и диких парнокопытных животных, которое может передаваться человеку. Существующие вакцины во многих случаях не вполне эффективны. Целью настоящего исследования была оценка возможности использования золотых наночастиц (ЗНЧ) в качестве носителя антигена и адьюванта. Для оценки иммуногенных свойств наночастиц золота был синтезирован конъюгат ЗНЧ с синтетическим пептидом белка VP₁ капсида вируса ящура. Полученным конъюгатом (с использованием или без использования полного адьюванта Фрейнда (ПАФ)), а также коммерческой вакциной и нативным пептидом иммунизировали морских свинок. После завершения иммунизации определяли титр и чувствительность образовавшихся антител.

Полученные данные характеризуют влияние ЗНЧ на иммунный ответ морских свинок при иммунизации синтетическим пептидом белка VP₁ капсида вируса ящура по сравнению с иммунизацией коммерческой противоящурной вакциной и нативным пептидом. Установлено, что конъюгаты ЗНЧ с иммуногенным пептидом в смеси с ПАФ индуцируют значительно более выраженный иммунный ответ, что проявлялось в более высоком титре получаемых антител, их более высокой чувствительности при иммуноанализе антигена. При этом процесс биосинтеза антител сопровождался увеличением продукции провоспалительных цитокинов (особенно интерферона- γ) и стимуляцией дыхательной активности перитонеальных макрофагов. При использовании во всех тестах конъюгата ЗНЧ-пептид без добавления ПАФ эффект данного препарата оказался сравнимым с действием стандартной вакцины, а ряде случаев достоверно превосходящим его, что позволяет надеяться на возможность использования в дальнейшем ЗНЧ в качестве единственного адьюванта при создании пептидных вакцин. Таким образом, полученные результаты создают основу для дальнейших исследований устойчивости к заражению вакцинированных животных ящуром с целью разработки противоящурной нановакцины однократного применения.

6.3. АЛГОРИТМ ДЛЯ ВЫЧИСЛЕНИЯ ПОЛНЫХ ВЕРОЯТНОСТЕЙ СБОРКИ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ АЛЬФА-БЕТА ЦЕПЕЙ

Назаров В.И.^{*,1,2}, Позорельский М.В.^{*,1}, Звягин И.В.¹, Лебедев Ю.Б.¹, Мамедов И.З.¹

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

² Национальный исследовательский университет "Высшая Школа Экономики", Москва

* Авторы внесли одинаковый вклад в работу

Электронный адрес: vd.naz@yandex.ru

Иммунная система должна распознавать огромное число разнообразных патогенов для обеспечения жизнеспособности организма. Это реализуется с помощью системы адаптивного иммунитета, где Т-клеточные рецепторы (ТСР) играют центральную роль, обеспечивая распознавание патогенов, отбор специфических к патогенам антител и запуск иммунного ответа. В геноме невозможно закодировать все возможные рецепторы в силу ограниченности его информационного объема, поэтому рецепторы образуются в результате V(D)J-рекомбинации - процесса, в котором последовательность гена рецептора собирается из нескольких закодированных в геноме сегментов, при этом выбор комбинации сегментов случаен, а на границах между сегментами могут происходить вставки случайных нуклеотидов и делеции. Одна и та же последовательность рецептора может собираться несколькими способами. На данный момент не было предложено способа вычисления полной вероятности сборки (с учетом всех возможных сценариев) ТСР.

Нами был разработан алгоритм для подсчета полной вероятности и перечисления всех возможных сценариев сборки для нуклеотидной последовательности ТСР с заданными вероятностями выбора V(D)J генов, вставок и делеций, основанный на выравнивании нуклеотидной последовательности ТСР и последовательности, полученной из конкатенированных нуклеотидных последовательностей V(D)J сегментов, представления матрицы выравнивания в виде графа и присваивании весов, соответствующих вероятности того или иного события (выбора определенного гена, индела и др.). В таком графе каждый сценарий сборки представляет собой путь в графе, вероятность сборки ТСР по какому-либо сценарию равна произведению вероятностей на ребрах этого пути, а полная вероятность ТСР равна сумме вероятностей всех сценариев и осуществляется с помощью алгоритма динамического программирования. Предложенный алгоритм реализован на связке языков R и C++. Быстродействие алгоритма позволяет проводить расчет вероятности сборки для целых репертуаров ТСР и позволяет рассчитывать вероятность встречи одинаковых последовательностей рецепторов в паре репертуаров.

6.4. КОНТАМИНАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО БТШ70 БАКТЕРИАЛЬНЫМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ ПОДАВЛЯЕТ ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЭТОГО ПРОТЕИНА НА ПРОДУКЦИЮ ФАГОЦИТАМИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

Перцева М.А., Троянова Н.И., Мирзоев Р.Р., Шевченко М.А., Сапожников А.М.

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

Электронный адрес: rita.pertseva74@gmail.com

Активные формы кислорода (АФК) продуцируются практически всеми типами клеток многоклеточных организмов и играют существенную роль в жизнедеятельности различных тканей и организма в целом. Однако многие аспекты регуляции продукции клетками АФК до сих пор остаются невыясненными. Ранее в нашей лаборатории было обнаружено, что одним из эндогенных факторов, вызывающих подавление продукции АФК фагоцитами, может быть внеклеточная форма белка теплового шока 70 кДа (БТШ70). Для анализа механизмов этого явления мы разработали ряд экспериментальных моделей с использованием различных типов фагоцитирующих клеток. Один из разделов проводимого нами исследования был посвящен анализу зависимости обнаруженного ингибирующего эффекта БТШ70 с присутствием в образцах этого белка примеси ЛПС. В результате, в экспериментах, проведенных *in vitro* культурами нейтрофилов, выделенных из костного мозга (КМ) мыши, было обнаружено, что низкие концентрации бактериальных липополисахаридов не влияют на фоновый уровень АФК в нейтрофилах КМ мыши, а высокие концентрации эндотоксинов вызывают повышение этого уровня. Следовательно, возможная контаминация используемого в наших экспериментах рекомбинантного БТШ70 липополисахаридом не может быть причиной ингибирующих эффектов этих протеинов, обнаруженных в наших моделях. Это подтверждается также проведенным нами сравнением действия на продукцию АФК неочищенного от ЛПС белка с эффектами очищенного с помощью полимиксина БТШ70, которое показало отсутствие достоверного ингибирующего эффекта у препаратов белка, загрязненных эндотоксином. Зарегистрированное отсутствие существенной реакции клеток КМ на ЛПС свидетельствует о принципиальном преимуществе использования модели тестирования активности внеклеточных БТШ70 по действию этого протеина на продукцию АФК от многих других моделей, применяемых для анализа иммуномодулирующих эффектов БТШ70, в которых препараты белка и примесь эндотоксина бактериального происхождения имеют одинаковую иммуностимулирующую направленность.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты РФФИ № 14-04-32203 и № 14-04-01280).

6.5. ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 кДа ВЛИЯТЬ НА ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ СЕТЕЙ (NETs) НЕЙТРОФИЛАМИ КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ

Постовская А.М., Сапожников А.М., Шевченко М.А.

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

Одним из типов защиты организма от экзогенных патогенов является нетоз - образование нейтрофилами внеклеточных сетей (NETs), состоящих из ДНК, гистонов и белков цитотоксических гранул. Хотя нетоз необходим для антимикробной защиты, в процессе образования NETs модифицированные ядерные антигены экспандируются и становятся доступными иммунной системе, что может спровоцировать аутоиммунные и другие воспалительные заболевания. Известно, что воздействие белка теплового шока 70 кДа (БТШ70) препятствует активации нейтрофилов периферической крови бактериальными патогенами.

В данной работе была изучена способность БТШ70 оказывать влияние на образование NETs нейтрофилами костного мозга мыши.

Нейтрофилы выделяли методом негативной селекции (MiltenyiBiotec) из костного мозга мышей BALB/c. Гомогенность популяции оценивали цитометрически (более 96% Gr1⁺CD11b⁺ клеток) или по морфологии при дифференциальном окрашивании (более 99% нейтрофилов). Нейтрофилы активировали фарбол-12-миристрат-13-ацетатом (PMA) в диапазоне концентраций 0,003-30 мМ или кальциевым ионофором (A23187) в диапазоне 5-500 мМ, в присутствии или без добавления 0,06 или 6 мМ БТШ70. После инкубации (37°C, 5% CO₂) препараты фиксировали и окрашивали с использованием сред NucBlue и ActinGreen (MolecularProbes). Оценку наличия и степени формирования NETs проводили при помощи конфокальной микроскопии.

В ходе работы были определены оптимальные концентрации активаторов нетоза PMA и A23187 - 0,3 и 5 мМ, соответственно. При инкубации нейтрофилов с PMA и A23187 в присутствии БТШ70 выявили пониженное наличие NETs. Максимальный протективный эффект - ядра не дефрагментируются, внеклеточные сети не формируются - наблюдали при наибольшей использованной концентрации БТШ70 (6 мМ).

Таким образом, показано, что экзогенный БТШ70 снижает уровень образования NETs, причем эффект увеличивается при повышении концентрации исследуемого белка. В дальнейшем планируется разработать количественный метод оценки степени нетоза и выяснить, препятствует ли БТШ70 формированию NETs или способствует их ускоренной деградации.

6.6. УРОВЕНЬ Der f 2 СПЕЦИФИЧНЫХ IgG₄ И IgE В СЫВОРОТКАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ С АЛЛЕРГИЕЙ НА КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ

Чудаков Д.Б., Каширина Е.И., Свирицевская Е.В.

Институт биоорганической химии имени акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва.
Электронный адрес: boris-chudakov@yandex.ru

Аллергия I типа опосредована формированием IgE антител в крови больных. При проведении специфической иммунотерапии (СИТ) в крови больных появляются IgG₄ антитела, что ассоциировано с клиническим улучшением. Не известно, имеются ли в крови больных с аллергией специфические к аллергену антитела IgG класса, в частности IgG₄ субкласса, до проведения СИТ.

Целью работы было определение уровней специфических к белку клеща домашней пыли *D. farinae* (КДП) Der f 2 IgG₄ и IgE в сыворотках крови больных с аллергией на КДП, с аллергией на другие аллергены, но без IgE антител к КДП, а также в сыворотках здоровых доноров.

Рекомбинантный Der f 2 был наработан в клетках *E. coli*. Уровни Der f 2 специфических IgG₄ и IgE в сыворотках крови больных с аллергией на КДП (n=14), гриб *A. alternata* (n=4) и здоровых доноров (n=4) оценивали с помощью иммуно-ферментного анализа (ИФА). Наличие IgE антител к КДП и *A. alternata* в сыворотках определяли также с помощью коммерческого набора RIDA.

Показано наличие достоверной (r=-0,61±0,21) обратной корреляции между титрами специфических IgG₄ и IgE в случае сывороток больных с аллергией к белкам КДП. Все сыворотки больных с аллергией к *A. alternata* были отрицательны по Der f 2 специфическому IgE, но положительны по Der f 2 специфическому IgG₄. В сыворотках здоровых доноров отсутствовали антитела обоих классов.

Полученные результаты показали, что появление IgE-продуцирующих В-клеток наблюдается преимущественно при отсутствии IgG₄ антител к тому же аллергену. Формирование антител IgG₄ класса вызывает, по-видимому, элиминацию В-клеток, продуцирующих IgE антитела. У больных с генетической предрасположенностью к аллергии могут формироваться IgG₄ антитела на некоторые аллергены, например, на КДП, как это наблюдали у больных с аллергией на гриб *A. alternata*. В этом случае у них может развиваться аллергия на другие аллергены. При отсутствии генетической предрасположенности иммунная система игнорирует аллергены.

СЕКЦИЯ 7

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

7.1. УЧАСТИЕ СИСТЕМЫ QUORUM SENSING В ПРОЦЕССЕ СТИМУЛЯЦИИ АЗИТРОМИЦИНОМ РОСТА БИОПЛЕНОК *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* 449

Ганнесен А.В., Журина М.В., Плакунов В.К., Нетрусов А.И.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва
Электронный адрес: Zxattogua@gmail.com

Биопленки - это пространственно и метаболически структурированные сообщества микроорганизмов, погруженные во внеклеточный полимерный матрикс и расположенные на границе раздела фаз. Считают, что более 90% всех микроорганизмов в природе живут в составе биопленок. В биопленках клетки микроорганизмов приобретают так называемый "биопленочный фенотип", отличающий их от планктонных клеток. В частности, клетки в биопленках в сотни раз более устойчивы к антибиотикам, нежели в планктонной культуре. Более того, антибиотики в определенных концентрациях могут не только не подавлять, но даже стимулировать рост биопленок. Поэтому исследование биопленок во всем мире является приоритетной задачей в области медицины (лечение хронических заболеваний), биотехнологии (новые промышленные процессы, основанные на биопленках), а также фундаментальной микробиологии.

В ходе формирования и функционирования биопленок особую роль играют системы quorum sensing: регуляторные механизмы, контролируемые многие клеточные и межклеточные процессы коммуникации. В своей работе мы показали, что у *P. chlororaphis* 449, у которого функционируют две таких системы, LasIR и RhlIR (гомологи системы LuxIR), где сигнальные функции выполняют молекулы N-ацилгомосеринлактонов (АГЛ), функционирование этих систем сопряжено с феноменом стимуляции роста биопленок. При помощи методики выращивания биопленок на тефлоновых блячках, разработанной в лаборатории нефтяной микробиологии Института микробиологии РАН, а также световой и флуоресцентной микроскопии биопленок, выращенных на стеклах, показана стимуляция азитромицином в концентрации 0.1-8 мкг/мл роста биопленок штамма дикого типа *P. chlororaphis* 449, а также отсутствие такой стимуляции у штамма с нарушенным накоплением АГЛ. Также продемонстрирован факт ингибирования биопленок *P. chlororaphis* 449 сверхнизкими концентрациями азитромицина (0,01-0,03 мкг/мл), что указывает на наличие в процессе формирования биопленок данного микроорганизма чувствительных и устойчивых к азитромицину процессов.

7.2. ИЗУЧЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА С РАЗНЫМИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ С ПОМОЩЬЮ ФОТОАКТИВИРУЕМОГО КРАСИТЕЛЯ

Генералов А.А.^{1,2}, Савина А.А.^{1,2}, Щербинина Т.С.^{1,3}, Сизова С.В.¹, Зайцев Ю.², Свирищевская Е.В.¹

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

² МГАВМиБ, Москва.

³ Центр "Биоинженерия" РАН, Москва.

Электронный адрес: GA_tactics_ind@mail.ru

Биосовместимый и биodeградируемый природный поликатион хитозан (Х) имеет большое количество реакционноспособных групп, что делает его удобным для получения функционализированных наночастиц. На основе Х можно получать системы доставки с разным зарядом и гидрофобностью. Однако внутриклеточный трафик Х изучен плохо. Для изучения внутриклеточного транспорта Х и наночастиц на его основе используют флуоресцентные красители. Фотоактивируемые красители дают большое разрешение изображения, высокий квантовый выход и устойчивы к выгоранию. Целью данной работы был анализ с помощью фотоактивируемого красителя TMP-NN-813 внутриклеточного транспорта производных Х с различными физико-химическими свойствами: разной молекулярной массой, степенью дезацетилирования (СД), зарядом и гидрофобностью. Получена панель ФИТЦ меченых производных хитозана с массами Х200, Х80, Х50, Х12, Х7 кДа; СД 90 (Х200), 70 (Х200), 50 (Х200); гидрофобномодифицированный (2-додецен-1-ил)янтраный ангидрид хитозан (С11-хитозан 200) и С11-сукциноилхитозан 200. Молекулярную массу хитозанов определяли вискозиметрией, СД и степень замещения - методом 1ЯМР. Анализ внутриклеточного трафика проводили на клетках макрофагов мыши RAW264.7. Хитозаны добавляли на 24, 48 и 72 ч инкубирования. В последние 30 мин добавляли TMP-NN-813, клетки фиксировали и анализировали с помощью конфокального микроскопа. Показано, что прохождение в клетки производных Х с зарядом +30 мВ на порядок хуже прохождение С11-сукциноилхитозан (заряд = -30мВ), при этом связывание с мембранами клеток выше у положительно заряженных Х. Из них прохождение в клетки падает в ряду Х7>Х12>Х50=Х80=Х200=С11Х, только Х7 и Х12 проходят в ядро. Остальные хитозаны частично попадают в лизосомы и митохондрии. Снижение СД способствует прохождению Х в клетки, что связано, по-видимому, с более компактной упаковкой Х с низкой СД. Полученные данные показывают, что для доставки препаратов в клетки предпочтительно использовать отрицательно заряженные производные хитозана и наночастицы на их основе.

7.3. QUORUM SENSING РЕГУЛЯЦИЯ У *BURKHOLDERIA CENOSEPCACIA* 370 И ЕЕ УЧАСТИЕ В КОНТРОЛЕ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ

Зайцева Ю.В., Веселова М.А., Плюта В.А., Кокишарова О.А., Хмель И.А.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва
Электронный адрес: khmel@img.ras.ru

Quorum Sensing (QS) - особый тип регуляции экспрессии генов бактерий, зависящей от плотности их популяции. Для изучения роли QS регуляции в контроле клеточных процессов *Burkholderia cenocepacia* был использован клинический изолят, штамм 370. Этот штамм синтезирует сигнальные молекулы QS систем N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ). В клетках штамма присутствуют гены QS систем - *cepI* и *cepR*; *cciI* и *cciR*. Штамм *B. cenocepacia* 370 обнаруживает потенциальные факторы патогенности: гемолитическую активность, внеклеточную протеазную активность, липазную активность, а также хитиноподобную активность. Синтез АГЛ в штамме 370 весьма слабый. Были получены пласпозонные мутанты с измененным синтезом АГЛ. Мутации в генах *pps* и *clpX* привели к усилению синтеза АГЛ, мутация в гене *lon* - к резкому снижению синтеза АГЛ. Мутация в гене *pps* не оказывала значительного влияния на свойства штамма 370. Инактивация гена *lon* приводила к снижению синтеза внеклеточных протеаз и гемолизина, отсутствию хитиноподобной активности, не влияла на липазную активность; практически не влияла на антагонистическую активность бактерии в отношении фитопатогенного гриба *Sclerotinia sclerotiorum*. Инактивация гена *clpX* не приводила к изменению синтеза факторов патогенности, не влияла на способность бактерий формировать биопленки, но снижала способность клеток к миграции по поверхности агаризованной среды (сворминг-миграция, swarming), не влияла на хитиноподобную активность, но приводила к увеличению антагонистической активности бактерий. По сравнению с исходным штаммом, в штамме с мутацией в гене *clpX* экспрессия 18 белков увеличивалась и одного снижалась. Мутации в генах *clpX*, *lon* и *pps* значительно снижали вирулентность бактерий при заражении беспородных мышей.

В клетки штамма *B. cenocepacia* 370 была передана плаزمид рМЕ6863, содержащая гетерологичный ген *aiiA* ацил-гомосеринлактоназы AiiA, деградирующей АГЛ. При использовании биосенсоров было показано отсутствие или сильное уменьшение содержания АГЛ в культуре. Присутствие в клетках *B. cenocepacia* 370 гена *aiiA* приводило к отсутствию гемолитической активности, снижению внеклеточной протеолитической активности; ослаблению сворминг-миграции. Не наблюдалось влияния введения гена *aiiA* на липазную активность, синтез жирных кислот, синтез HCN и образование биопленок. Показано, что перекись водорода в субингибиторных или слабо подавляющих рост концентрациях вызывала стимуляцию образования биопленок. Введение гена *aiiA* в клетки не снимало, но уменьшало этот эффект.

7.4. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КАПСУЛИРОВАННЫХ ВАКЦИН ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АЛЛЕРГИИ НА КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ

Каширина Е.И., Решетов П.Д., Рязанцев Д.Ю., Алексеева Л.Г., Свирицевская Е.В.

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

На данный момент существует единственный патогенетический метод лечения аллергии-аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ), представляющая собой длительный курс инъекций экстрактов аллергенов. Сокращение курса лечения требует увеличения дозы вводимого аллергена, что может повлечь за собой различные побочные эффекты вплоть до анафилактического шока и летального исхода. Причиной возникновения побочных эффектов является активация вводимыми аллергенами тучных клеток посредством IgE. Целью данной работы было получение безопасной формы аллергенов для проведения АСИТ.

В данной работе использован новый подход к созданию вакцин для лечения аллергии, в котором полноразмерные рекомбинантные белки-аллергены, способные вызывать дегрануляцию тучных клеток, упаковываются в безопасные, биodeградируемые, биосовместимые полимерные наночастицы. Упаковка аллергенов предотвращает их связывание с IgE, но сохраняет иммуногенные свойства, необходимые для вакцинирующего эффекта.

В качестве модельного аллергена использовали рекомбинантные белки клещей домашней пыли (КДП) Derf 1 и Derf 2, которые упаковывали в наночастицы, полученные на основе лаурил-сукциноилхитозана (ЛСХ) и альгината. Производное хитозана получали реакцией карбоксиацилирования ангидридным методом; остаток лауриновой кислоты вводили методом активированных эфиров. Частицы формировали методом самосборки. На полученных частицах проводили иммобилизацию Der f1 и Der f2 карбодимидным методом по реакции нуклеофильного присоединения. На полученные наночастицы наносили оболочку из альгината (АЛГ). Целевые конструкции представляли собой опалесцирующие суспензии наночастиц размером 200±100 нм с зарядом -13±3 мВ. Ранее нами было показано отсутствие связывания белками Der f1 и Der f2, упакованными в наночастицы, IgE из сывороток больных с аллергией на КДП.

В данной работе изучали эффект иммунизации мышей наночастицами ЛСХ-Derf и наночастицами ЛСХ-Derf-АЛГ. Показано, что при упаковке полноразмерных белков в наночастицы формируются IgG антитела, что указывает на наличие контакта иммуноглобулинов, экспонированных на поверхности В-клеток, с аллергеном.

7.5. ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ ИЗОКОЛХИЦИНОИДОВ С ХИТОЗАНОМ

Кузнецов А.Г.¹, Войтович Ю.В.², Свищевская Е.В.¹

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

² Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

Электронный адрес: Dia Wolf@mail.ru

Колхицин и его производные являются высокоактивными ингибиторами полимеризации тубулина, что приводит к аресту деления клеток. Однако колхицин не применяют для лечения опухолей из-за высокой нейротоксичности. Известно, что через гематоэнцефалический барьер проходят только низкомолекулярные препараты. Одним из способов снижения нейротоксичности производных колхицина может быть повышение молекулярной массы за счет конъюгирования с биосовместимым полимером. Целью данной работы было получение и анализ активности *in vitro* конъюгата синтезированной нами ранее производной колхицина 10с с хитозанами массой 7 и 12 кДа (X7 и X12). Конъюгирование осуществляли карбодимидным методом; оставшиеся активированные группы гасили глицином; конъюгаты диализовали для очистки от свободного препарата. Для визуализации в конъюгат вводили флуоресцеинизотиоцианат. Размер молекул свободного препарата 10с и конъюгатов X7-10с и X12-10с оценивали с помощью динамического светорассеяния и с помощью конфокальной микроскопии. Показано достоверное увеличение размера молекулы при конъюгировании с хитозанами. По данным микроскопии конъюгат X7-10с образовывал агрегаты, а X12-10с формировал наночастицы размером 80 нм. Активность препарата в составе X12-10с оценивали методом МТТ на клетках линий HepG2, HaCaT, RAW246.7 и VxPC-3. Показано, что препарат 10с активен также и в составе конъюгата. Таким образом, впервые получен конъюгат новой производной колхицина с хитозаном, что привело к увеличению массы и размера молекулы.

7.6. ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗЫ II В ОБРАЗОВАНИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ТЕПЛОВЫМ ШОКОМ ДВУЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК

Лузгин А.В.^{1,2}, Кантидзе О.Л.¹, Величко А.К.¹

¹ Институт биологии гена РАН, Москва

² Пензенский государственный университет, Пенза

Электронный адрес: artyom.luzhin@gmail.com

Известно, что тепловой шок приводит к образованию двуцепочечных разрывов ДНК в клетках млекопитающих. Недавно нами было показано, что это происходит только в G1- и G2-фазах клеточного цикла. Эти разрывы маркируются с помощью АТМ-зависимого фосфорилирования гистона H2AX. Не ясно, однако, каков механизм формирования двуцепочечных разрывов ДНК в условиях теплового стресса. Одним из возможных механизмов, индуцированных тепловым шоком, может быть подавление активности ДНК-топоизомеразы II (топо2) - фермента, изменяющего топологию ДНК путем внесения временных двуцепочечных разрывов в ДНК. Мы продемонстрировали, что тепловой шок эффективно ингибирует активность топо2 как *in vitro*, так и *in vivo*. Было также показано, что обработка клеток каталитическим ингибитором топо2 приводит к отмене повреждающих ДНК эффектов теплового шока. С помощью метода преципитации ковалентных комплексов топо2-ДНК показано, что тепловой шок приводит к образованию двуцепочечных разрывов ДНК путем специфического ингибирования одной из изоформ топо2 - ДНК-топоизомеразы ЦВ. Таким образом, в этой работе был определен механизм образования индуцированных тепловым шоком двуцепочечных разрывов ДНК.

7.7. НОВЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В 2D И 3D УСЛОВИЯХ

Мырсыкова Е.В., Гречихина М.В., Свирицевская Е.В.

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

Наиболее эффективной и максимально приближенной по свойствам и организации к естественной опухоли системой, используемой в настоящее время при скрининге потенциальных противоопухолевых препаратов, могут быть 3D-культуры. Однако плохое понимание физиологии 3D культур приводит к противоречивым результатам. Целью данной работы была разработка метода анализа функциональной активности клеток рака поджелудочной железы в 2D и 3D культурах. В работе использовали клеточные линии ВхРС-3, Colo-357, PANC-1, MiaPaCa-2 и ТЗМ4. 3D Сфероиды формировали в течение 3 и 6 дней на антиадгезивной пленке PolyHEMA; 2D культуры выращивали на обычном пластике. Известно, что падение функциональной активности клеток ассоциировано со снижением потенциала митохондрий, а апоптотические клетки становятся проницаемыми для йодистого пропидия (PI). Для оценки уровня апоптоза и потенциала мембран митохондрий клетки трипсинили и проводили витальное окрашивание флуоресцентным красителем 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC6), чувствительным к потенциалу митохондрий, и (PI) и анализировали с помощью метода проточной цитометрии. После анализа клетки фиксировали, перфорировали детергентом, дополнительно окрашивали ядра PI и сравнивали уровень окрашивания DiOC6 с фазой клеточного цикла. Показали, что при витальном окрашивании DiOC6/PI клетки разделяются на три популяции: DiOC6highPIlow; DiOC6,lowPIlow, и DiOC6,lowPIhigh. Анализ перфорированных клеток показал, что данные популяции соответствуют клеткам в G2/M, G1 фазах и апоптотным клеткам, соответственно. При анализе витальных 2D и 3D культур панкреатических клеток показали, что в 3D культурах ВхРС-3 и ТЗМ4 значительная доля клеток уходит в апоптоз, а также снижается доля клеток DiOC6highPIlow, что коррелирует со снижением доли клеток в G2/M фазе, что также было подтверждено с помощью анализа клеточного цикла в перфорированных клетках. В клетках Colo-357, MiaPaCa-2 и PANC-1 соотношение покоящихся и делящихся клеток не менялось, но значительное количество клеток уходило в апоптоз. Таким образом, с помощью нового простого метода анализа функциональной активности клеток показано различие не только между клетками 2D и 3D культур, но и между линиями клеток, что в настоящее время является актуальным для понимания различий между публикуемыми литературными данными.

7.8. ДЕЙСТВИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА БИОПЛЕНКИ БАКТЕРИЙ

Плюта В.А., Колегова А.С., Липасова В.А., Хмель И.А.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва
Электронный адрес: plyutaba@gmail.com

Большинство бактерий существуют в природных экосистемах в виде специфически организованных, прикрепленных к различным поверхностям биопленок. Бактерии, живущие внутри биопленок, проявляют более высокую устойчивость к действию антибактериальных факторов. Способность патогенных бактерий формировать биопленки вызывает проблемы в медицине, с/х, микробиологической и др. областях. Поэтому изучение действия на биопленки различных соединений с антибактериальной активностью представляет большой интерес.

Бактерии способны синтезировать летучие органические соединения (ЛОС), подавляющие рост бактерий и грибов. Продукция ЛОС является новым, слабо изученным аспектом конкурентных отношений микроорганизмов.

В настоящей работе было исследовано действие пула ЛОС, продуцируемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, и известных ЛОС (диметилдисульфида, 2-нонанона, 2-гептанона, 2-ундеканона и 1-ундецена) на биопленки бактерии *Agrobacterium tumefaciens* C58. Было показано, что ЛОС бактерий способны подавлять образование биопленок *A. tumefaciens* C58 и убивать бактерии в зрелых биопленках, причем гибель бактерий, живущих в составе биопленок, происходила при более высоких концентрациях ЛОС, чем образование биопленок. Используя различные *lux*-репортерные штаммы *Escherichia coli*, применяемые для определения N-ацил-гомосеринлактонов (АГЛ) - сигнальных молекул Quorum Sensing систем, было показано, что ЛОС подавляют функционирование QS систем.

Также было исследовано влияние пероксида водорода (H_2O_2) на образование биопленок *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Было показано, что H_2O_2 в субингибиторных концентрациях и/или концентрациях, слабо подавляющих рост бактерий, оказывает стимулирующее действие на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1. Известно, что в регуляции формирования биопленок ряда бактерий участвуют QS системы. В клетки *P. aeruginosa* PAO1 была введена плазида pME6863, содержащая гетерологичный ген *aiiA*, кодирующий N-ацил-гомосерин лактоназу AiiA. Синтез клетками данного фермента, деградирующего АГЛ, приводил к отсутствию стимуляции образования биопленок при действии H_2O_2 . Это показывает, что стимуляция формирования биопленок в присутствии H_2O_2 зависит от функционирования QS систем.

7.9. ЭКСПРЕССИЯ АУТОАНТИГЕНА ПУЗЫРЧАТКИ ДЕСМОГЛЕИНА 3 В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ

Прохоров А.В.¹, Коцарева О.Д.¹, Замолотчиков Р.Д.², Свирицевская Е.В.¹

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

² Институт хирургии им. А.В. Вишневского МЗ РФ, Москва
Электронный адрес: sashapro2006@yandex.ru

Вульгарная пузырчатка (ВП) является тяжёлым аутоиммунным заболеванием, при котором в крови больных появляются аутоантитела к десмоглеину 3 (ДСГ3). Десмоглеин 3 относится к трансмембранным белкам адгезии, участвующим в формировании прочных десмосомальных контактов между клетками многослойного эпителия. Считается, что ДСГ3 экспрессируют кератиноциты эпидермиса кожи и клетки многослойного неороговевающего эпителия. Связывание аутоантител к ДСГ3 с кератиноцитами кожи или клетками многослойного эпителия приводит к формированию внутриэпителиальных пузырей - акантолизу. Целью данной работы являлся анализ экспрессии ДСГ3 на клетках эпителия разного происхождения. В работе использовали клеточные линии кератиноцитов, клеток поджелудочной железы, почки, печени, кишечника, молочной железы, легкого, меланомы и другие. Анализ проводили методами полимеразной цепной реакции, Вестерн блоттинга, иммуноцитологического и иммуногистологического окрашивания клеток и биопсии ткани. Среди клеток различного происхождения выявили, что клетки поджелудочной железы VxPC-3, T3M4 и ASPC-1 экспрессируют в составе десмосом ДСГ3. Аналогичная экспрессия была показана на клетках кожи HaCaT и A431. Клетки простого эпителия HEK293, HepG2, HBL-100, MeWo и другие экспрессировали E-кадгерин и десмоглеин 2, но не ДСГ3. Для оценки экспрессии ДСГ3 нормальными клетками поджелудочной железы получали биопсию нормальной ткани поджелудочной железы от больных, оперированных по поводу фиброза или рака железы. Показали, что клетки протоков железы экспрессируют E-кадгерин, ДСГ2, а также ДСГ3, что ранее не было известно. Таким образом, при пузырчатке возможно повреждение не только кожи и полости рта, но и поджелудочной железы. Известно, что частота диабета у больных ВП достоверно выше

7.10. ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КАРДИОМИОБЛАСТАХ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

Синицына И.А., Шрам С.И.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва
Электронный адрес: irina0140@gmail.com

Одним из наиболее распространенных и опасных осложнений сахарного диабета является диабетическая кардиомиопатия (ДК) - некоронарогенное поражение миокарда, характеризующееся целым рядом метаболических, морфологических и функциональных нарушений, приводящих к развитию застойной сердечной недостаточности. При ДК происходит нарушение нормального баланса про- и антиоксидантов в клетке, что ведет к увеличению уровня активных форм кислорода и одонитевых разрывов ДНК. Важной системой регуляции клеточных процессов в ответ на повреждения ДНК является система поли(АДФ-рибозил)ирования белков. Однако функционирование этой системы в условиях диабета или на его моделях до сих пор мало изучено. Целью работы было выяснить влияние гипергликемии на активность процессов образования и деградации поли(АДФ)-рибозы (ПАР) в экспериментах на культивируемых клетках кардиомиобластов крысы.

Эксперименты проводили на стационарной культуре кардиомиобластов крысы H9c2. Клетки растили до состояния монослоя, после чего выдерживали в среде с низким содержанием сыворотки еще 2 дня. Гипергликемию моделировали увеличением концентрации глюкозы в среде с 5 до 30 мМ. Для определения содержания ПАР в клетке использовали метод иммунофлуоресцентного анализа. Инкубация клеток в среде с повышенным содержанием глюкозы приводила к увеличению (по сравнению с контролем) уровня ПАР в ядрах уже через 6 ч после увеличения концентрации глюкозы. При этом через 24 ч различий в базальном уровне ПАР не обнаружили. Для исследования способности клеток к синтезу/деградации ПАР в ответ на массивированные повреждения ДНК определяли профиль изменения иммунофлуоресценции ПАР в ядрах в течение 1 ч после короткой аппликации H₂O₂. Показано, что в клетках H9c2, предварительно культивировавшихся в течение 7 дней в условиях гипергликемии, уровень ПАР в ядрах был ниже, чем в контрольных клетках, причем на протяжении всего исследуемого периода. В дальнейшем планируется изучить, какие именно компоненты системы поли(АДФ-рибозил)ирования белков претерпевают наибольшие изменения в условиях гипергликемии и какими молекулярными процессами это обусловлено.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-04-90450).

7.11. БЕЛОК SgpR ШТАММА *P. PUTIDA* AK5 – НОВЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ *LysR*-СЕМЕЙСТВА РЕГУЛЯТОРОВ ГЕНОВ ДЕГРАДАЦИИ САЛИЦИЛАТА

Филатова И.Ю.^{1,2}, Музафаров Е.Н.², Захарова М.В.¹

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

²Тульский государственный университет, Тула
Электронный адрес: irafilatova24@gmail.com

Известны два пути бактериальной деградации нафталина. Первый путь, который контролируется "классическими", детально исследованными *nah*-оперонами, - трансформация нафталина до интермедиатов цикла Кребса через салицилат и катехол. Второй путь - утилизация нафталина через образование и последующее окисление салицилата и гентизата. Штамм *Pseudomonas putida* AK5, который относится к γ -протеобактериям, - первый описанный природный штамм, в котором присутствуют как "классический" *nah1*-оперон, так и *sgp*-оперон (salicylate-gentisate pathway). Наиболее изучены регуляторные белки NahR "гентизатного" пути представителей β -протеобактерий, штаммов *Ralstonia sp. strain* U2 и *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, гомологичные NahR белкам *nah*-оперонов деградации салицилата штаммов *P.putida* G7 (pNAH7) и *P.putida* NCIB9816-4 (pDTG1), при этом о регуляции транскрипции генов катаболизма салицилата известно крайне мало. Белок SgpR имеет низкую гомологию с указанными выше регуляторами, а значит, для выявления механизма регуляции, в первую очередь необходимо было определить сайт связывания для исследуемого белка.

Для получения белка SgpR использовали экспрессионную систему *E.coli* M15[pREP4;pQE30/*sgpR*]. При индукции в стандартных условиях весь белковый продукт находится в тельцах включения. Уменьшение температуры индукции и концентрации индуктора позволило получить препарат с содержанием белка 254 нг/мкл. Методом делеционного картирования было показано, что белок SgpR связывается с фрагментом ДНК длиной 200 п.н., в который входит область между дивергентно транскрибируемыми генами *sgpR* и *sgpA*. Методом биоинформатического анализа в этой области обнаружили последовательности ДНК, которые могли бы являться потенциальными промоторами генов *sgpR* и *sgpA*. Методом DNase I footprinting подтвердили, что белок SgpR взаимодействует с районом ДНК, на котором расположены потенциальные промоторы. Показано, что белок SgpR связывается с ДНК в виде тетрамера. Исследовано влияние белка SgpR на транскрипцию с предполагаемых промоторов *sgp*-оперона в системе *in vitro*.

Полученные данные указывают на то, что белок SgpR действительно является регулятором транскрипции генов деградации салицилата штамма *P.putida* AK5.

7.12. ГЕНЫ СЕМЕЙСТВ *Agr* И *Ras-dva* УЧАСТВУЮТ В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ У НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ

Шандарин И. Н., Зарайский А.Г., Терёшина М.Б.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
shandarin.igor@yandex.ru

Низшие позвоночные в отличие от высших способны эффективно регенерировать повреждённые ткани и органы. Недавно мы обнаружили гены из семейств *Agr* и *Ras-dva*, которые пропадают у предков высших позвоночных. Мы предположили, что эти гены могут участвовать в регенерации у низших позвоночных, а их утрата обуславливает резкое снижение способности к регенерации у высших позвоночных. Ранее мы показали, что гены семейства *Agr* активируются в ходе регенерации у головастиков *Xenopus laevis*. Целью настоящей работы было изучение активности и роли генов *Ag1* и *Ras-dva* в процессе регенерации на модели рыб *Danio rerio*.

Мы использовали следующие методы: ПЦР в реальном времени, гибридизация *in situ* и инъекция морфолиновых олигонуклеотидов.

В результате было установлено, что ген *Ag1* в норме активно экспрессируется в эпителии плавников рыбы *Danio*. Было показано, что уровень экспрессии гена *Ag1* в плавниках рыбы снижается в течение первых двух дней после ампутации, но возрастает на 5-й день до базового уровня. Показано, что ингибирование активности гена *Ag1* в хвостовых плавниках *Danio* подавляет процесс регенерации. Также удалось установить, что в норме гены *Ras-dva1* и *Ras-dva2*, относящиеся к семейству малых ГТФаз *Ras-dva*, слабо экспрессируются в тканях плавников *Danio*. Но после ампутации плавников наблюдается активный рост уровня экспрессии *Ras-dva1* и *Ras-dva2* в регенерирующих плавниках *Danio*. Полученные результаты указывают, что гены *Ag1* и *Ras-dva* вовлечены в регуляцию процессов регенерации у низших позвоночных.

СЕКЦИЯ 8

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ

8.1. ТЕСТИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО СОЕДИНЕНИЯ ПЛАТИНЫ НА МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ

Алексеев Г.В., Чжан Цюши

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
Электронный адрес: komelbud@mail.ru

Побочные эффекты, возникающие при использовании в противоопухолевой химиотерапии металлосодержащих препаратов (например, нейро-, нефро- и кардиотоксичность при использовании самого известного противоопухолевого препарата этого класса - цис-диаминдихлорплатины или цисплатина), вынуждают проводить синтез новых соединений с целью увеличения избирательности действия и уменьшения токсичности таких препаратов. Известно, что основной мишенью действия противоопухолевых препаратов на основе платины является молекула ДНК. Цисплатин и его аналоги по действию схожи с алкилирующими агентами. При испытании новых координационных соединений платины принято проводить проверку препарата с использованием модельных систем - растворов ДНК. Проверка связывания препаратов *in vitro* с молекулой ДНК и сопоставление результата с комплексами, формируемыми при использовании цисплатина, дают возможность провести первичный отбор перспективных соединений.

В данной работе поставленная задача, напротив, была сформулирована после проведения испытаний действия нового препарата на клеточном уровне и с использованием грызунов. Соединение с условным названием ВР-С1 представляет собой препарат двухвалентной платины, содержащий сложный лиганд - продукт переработки лигнина. Исследование его взаимодействия с ДНК было обусловлено необходимостью сравнения молекулярного механизма его действия с действием известных препаратов - цисплатина и карбоплатина. Комплексное исследование взаимодействия проводили с использованием методов спектрофотометрии, кругового дихроизма, вискозиметрии, двойного лучепреломления в потоке. В результате было показано, что действие препарата ВР-С1 отличается от связывания цисплатина с ДНК, тогда как карбоплатин близок по молекулярному механизму комплексообразования с макромолекулой. Получены изображения комплексов методом атомной силовой микроскопии.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 13-03-01192А) и СПбГУ (№ 11.38.644.2013).

8.2. ВЛИЯНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ РАЗРЯЖЕННОГО ФОТОПРОТЕИНА ОБЕЛИНА

Алиева Р.Р., Кудряшева Н.С.

Сибирский федеральный университет, Красноярск
Электронный адрес: alieva_rosa@mail.ru

Фотопротеин обелин ответственен за биолюминесценцию морского гидроида *Obelia longissima*. Так как биолюминесцентная реакция обелина запускается ионами кальция, этот фотопротеин используют для мониторинга содержания внутриклеточного кальция в биомедицинских исследованиях. С другой стороны, продукт биолюминесцентной реакции обелина - разряженный обелин (РО) - способен флуоресцировать под действием возбуждающего света и может использоваться в качестве флуоресцентной метки для мониторинга внутриклеточных процессов. Известно, что подобные флуоресцентные протеины делают видимыми места локализации различных процессов, например, роста раковых опухолей. Современные технологии позволяют синтезировать обелин прямо в клетке. РО стабилен и нетоксичен; спектры его флуоресценции представляют собой суперпозицию нескольких компонентов (эмиттеров), соответствующих различным флуоресцентным формам целентерамида, вклад которых в суммарный спектр может изменяться при варьировании эффективностей протонных взаимодействий в активном центре РО. Соотношение вкладов компонентов в этих спектрах определяет цвет люминесценции. Варьировать цвет люминесценции РО можно как генетическими, так и физико-химическими методами, влияющими на стабильность активного центра РО.

Цель работы - расширить применимость фотопротеина и изучить возможность его использования в качестве биомаркера на повреждающее воздействие физико-химических факторов.

В работе изучено влияние интенсивности и цвета флуоресценции разряженного обелина хронического воздействия температуры (40°C), экзогенных веществ (глицерина и этанола), которые являются распространенными биомедицинскими агентами. Спектры флуоресценции были разделены на гауссовы компоненты - ультрафиолетовую, сине-зеленую и красную, соответствующие испусканию соответственно триптофана, целентерамида и гипотетического эксиплекса. Исследования проводились при различных длинах волн фотовозбуждения РО. Установлено, что хроническое воздействие температуры (40°C) и добавление спиртов увеличивает вклады ультрафиолетовой, фиолетовой и красной компонент, в то время как вклады голубой и зеленой компонент уменьшаются. Все изменения в спектрах связаны с уменьшением эффективности переноса протона в возбужденном состоянии целентерамида под воздействием деструктивных физико-химических факторов.

8.3. РАЗРАБОТКА ПИЛОТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНАЛОГОВ ЛАКТАПТИНА RL2SH И RL2S

Артемова К.Г., Степаненко В.Н., Есипов Р.С.

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

Рак молочной железы (РМЖ) является самой распространенной формой рака у женщин. Из-за раннего метастазирования и высокой скорости роста этого вида рака часто уже на стадии хирургического вмешательства у пациентов имеются отдаленные метастазы, также высока вероятность рецидива. Поэтому поиск и разработка новых противоопухолевых препаратов для неoadьювантной и адьювантной терапии является одним из перспективных направлений в борьбе с этим онкологическим заболеванием.

Ранее в ИХБФМ СО РАН (Новосибирск) был открыт и изучен пептид "лактаптин", фрагмент каппа-казеина, выделенный из грудного женского молока, размером 8,6 кДа. Данный белок показал высокоселективную цитотоксическую активность по отношению к клеткам аденокарциномы молочной железы. На его основе был получен синтетический аналог - лактаптин RL2, размером 13,1 кДа. Создание препарата на основе данного белка может стать важным шагом в терапии РМЖ и других онкологических заболеваний, в связи с чем возникла необходимость в биотехнологическом способе его получения.

Для облегчения разработки схемы выделения лактаптина RL2 в ходе работы был осуществлен сайт направленный мутагенез восьмого цистеина на серин для предотвращения образования димеров. Таким образом, были получены генетические конструкции для двух аналогов лактаптина RL2SH и RL2S, последний также не содержит на конце аффинной метки His-tag, в отличие от оригинального RL2. Были оптимизированы условия культивирования штаммов-продуцентов и разработана эффективная методика выделения целевого продукта посредством двустадийной хроматографической очистки сначала на катионообменном сорбенте и затем посредством ОФ ВЭЖХ.

В соответствии с данной методикой была наработана опытная партия аналогов лактаптина RL2SH и RL2S в количестве 30 мг каждого и передана для исследования биологической активности в ИХБФМ СО РАН. Оба пептида показали биологическую активность, соизмеримую с оригинальным лактаптином RL2.

8.4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ КАРОТИНОИДГЕНЕЗА КАК ПОДХОД ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕСКАРОТИНОИДНЫХ ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ У ПУРПУРНЫХ СЕРНЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Ашихмин А.А., Большаков М.А., Махнева З.К., Ерохин Ю.Е., Москаленко А.А.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино
Электронный адрес: AshikhminAA@gmail.com

Обобщены результаты работы лаборатории по использованию ингибитора каротиноидгенеза - дифениламина (ДФА) при выращивании клеток пурпурных серных фотосинтезирующих бактерий. В качестве основных объектов исследования использованы две пурпурные серные бактерии *Allochrochromatium (Alc.) minutissimum* и *Ectothiorodospira (Ect.) haloalkaliphila*. Установлено, что в клетках этих бактерий с помощью ДФА удается подавить биосинтез каротиноидов на 95-99%, при этом происходит сборка полного набора пигмент-белковых комплексов LH1-RC и LH2. Обнаружено, что при ингибировании биосинтеза каротиноидов с помощью ДФА предшественники окрашенных каротиноидов (фитоин, фитофлуин) не накапливаются в клетке и не замещают собой окрашенные каротиноиды. Показано, что ДФА в клетках *Alc. minutissimum* и *Ect. haloalkaliphila* оказывает влияние на фермент фитоинсинтетазу. Предложен оригинальный подход для расчета содержания каротиноидов в мембранах и пигмент-белковых комплексах из клеток пурпурных бактерий с ингибированным биосинтезом каротиноидов, который основывается на определении содержания "свободных каротиноидных карманов". Применение этого подхода позволяет устранить системную ошибку, которая возникает при использовании стандартного метода вычисления содержания каротиноидов, когда все "выжившие" после ингибирования биосинтеза каротиноиды приравниваются к 100%.

Из клеток с максимально ингибированным синтезом каротиноидов выделены бескаротиноидные комплексы LH2, которые в настоящее время не удается получить методами классического или транспозонового мутагенеза. Изучен ряд свойств полученных комплексов LH2 (поглощение, флуоресценция, возбуждение флуоресценции, КД, термостабильность и фотоустойчивость). Установлено, что у *Alc. minutissimum* и *Ect. haloalkaliphila* каротиноиды не являются обязательным компонентом для сборки комплексов LH1-RC и LH2 *in vivo*.

Работа частично поддержана грантами РФФИ № 13-04-01184а, № 12-04-00412а и грантом Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ № НШ-4771.2014.4.

8.5. ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА 4-КУМАРАТ-КоА-ЛИГАЗЫ В РАСТЕНИЯХ ОСИНЫ (*POPULUS TREMULA* L.) НА ЕЕ УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИТОПАТОГЕННЫМ БАКТЕРИЯМ

Барина Е.Д.¹, Виноградова С.В.¹, Ковалицкая Ю.А.², Шестибратов К.А.², Kamiонская А.М.¹

¹ Центр "Биоинженерия" РАН, Москва

² Филиал Института биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино

Электронный адрес: svetlana.vinogradova@biengi.ac.ru

Одной из важнейших задач биотехнологии для целей лесоперерабатывающей про-мышленности является разработка методов снижения содержания лигнина в древесных растениях. При этом важно сохранить фенотип растений дикого вида. Лигнин - один из основных компонентов древесины, который обеспечивает механические свойства стеблей растений и снижает проницаемость клеточных стенок для фитопатогенов. Изменения в содержании и составе лигнина могут привести к изменениям фенотипа растения и его устойчивости к биотическим факторам. Поэтому целью данной работы было изучить устойчивость к фитопатогенным бактериям у трансгенных растений осины с пониженным содержанием лигнина.

Были получены трансгенные растения осины (*Populus tremula* L.) с пониженной экспрессией гена 4-кумарат-КоА-лигазы (4CL), одного из ключевых ферментов биосинтеза лигнина в растении, и протестированы на устойчивость к распространенным фитопатогенным бактериям из родов *Xanthomonas* и *Erwinia*. Листья контрольных и трансгенных растений, адаптированных к условиям защищенного грунта в возрасте 2-3 месяцев, инфицировали бактериями методом клип-инокуляции и прямого укола листьев бактериальной суспензией бактерий с оптической плотностью 0,4. Проявление реакции сверхчувствительности и развитие симптомов наблюдали на 2, 3, 5 и 7 день после инокуляции.

В ходе работы было установлено, что все протестированные трансгенные и нетрансгенные растения устойчивы к бактериям *Xanthomonas arboricola*. Кроме того, было отмечено увеличение устойчивости к бактериям *Erwinia amylovora* штаммов 497, 496, 109, 31 у трансгенных линий осины с пониженным уровнем экспрессии гена 4CL и сниженным содержанием лигнина по сравнению с нетрансгенными растениями. Таким образом, снижение содержания лигнина в древесине трансгенных растений с пониженной экспрессией гена 4CL не приводило к снижению устойчивости к фитопатогенным бактериям *X. arboricola* и *E. amylovora*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-08-3166714.

8.6. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ В ЖЕЛАТИНОВЫХ И КРАХМАЛЬНЫХ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ РЕАГЕНТАХ ДЛЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Безруких А.Е., Есимбекова Е.Н., Кратасюк В.А., Яхно Т.А.

Сибирский федеральный университет, Красноярск

Электронный адрес: aebезрукiћ@gmail.com

В настоящее время разрабатываются желатиновый и крахмальный иммобилизованные реагенты для биолуминесцентного анализа на основе биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза. Реагенты представляют собой высушенные капли желатинового/крахмального геля объемом 25 мкл с добавлением ферментов (люциферазы и NADH:FMN-оксидоредуктазы) и их субстратов. Гели готовятся на основе 0.05 М калий-фосфатного буфера, pH 6.8. Целью работы было определить расположение компонентов в иммобилизованных реагентах и сравнить динамику высыхания реагентов разного состава. В работе были использованы микроскопы различной степени увеличения и сенсорное устройство на основе кварцевого резонатора.

Было показано, что буферные соли концентрируются в центре высохших желатиновых и крахмальных капель и образуют кристаллы. При этом кристаллизация буферных солей имеет различный характер: в желатиновом окружении наблюдаются игольчатые кристаллы, а в крахмальном - перьевидные. Это может объясняться различным содержанием связанной воды в высушенных гелях.

Выяснить точное местоположение ферментов внутри иммобилизованных реагентов данным методом не удалось. Субстрат FMN распределен по всей площади высохших крахмальных капель и локализован в центральной части высохших желатиновых капель. Это объясняется тем, что молекулы FMN взаимодействуют с молекулами крахмала и удерживаются в высыхающих областях, в то время как взаимодействие с желатином не происходит и молекулы FMN в ходе высыхания следуют за жидкой фазой к центральной части. Добавление субстрата тетрадеканала приводит к нарушению однородности крахмальных высушенных капель, а именно к возникновению зернистой структуры геля и круговых кристаллов буферных солей (сферолитов) в центральной части. Данный эффект обусловлен выраженными гидрофобными свойствами тетрадеканала.

Таким образом, динамика распределения компонентов и их конечное местоположение в желатиновых и крахмальных высушенных каплях различаются, что может быть причиной различия характеристик желатиновых и крахмальных иммобилизованных реагентов.

8.7. ДИНАМИКА ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЁНОК АНАММОКС-БАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ ПРОТОЧНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В АНАЭРОБНОМ ЛАБОРАТОРНОМ БИОРЕАКТОРЕ

Бочкова Е.А., Литти Ю.В., Ножевникова А.Н.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва
Электронный адрес: botchkovaekat@gmail.com

Анаммокс-бактерии - микроорганизмы, осуществляющие анаэробное окисление аммония нитритом с образованием молекулярного азота. Эти микроорганизмы широко используются в биотехнологии, в системах биологической очистки сточных вод.

Анаммокс-бактерии имеют тенденцию к прикрепленному росту с формированием биоплёнок. В данной работе исследовались биоплёнки, сформированные в условиях проточного культивирования в реакторе со стратификацией по концентрации азотных субстратов для анаммокс-процесса. В состав микробного сообщества биореактора входят представители трёх видов анаммокс-бактерий (один вид рода *Candidatus 'Jettenia'* и два вида рода *Candidatus 'Brocadia'*), а также представители нитрифицирующих бактерий и некультивируемые виды *Chloroflexi*. Анаммокс-бактерии, присутствующие в биоплёнках, используют азотные субстраты как в очень высокой (6,5 г N /л сут), так и в очень низкой концентрации (менее 0,01 г N /л сут).

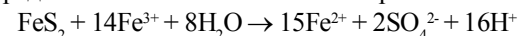
Начало формирования биоплёнок *de novo* (на погруженных в реактор предметных стеклах) обнаруживается примерно на 10-12 сут. С помощью методов световой микроскопии и FISH установлено, что процесс происходит при участии анаммокс-бактерий, а также нитчатых форм, по всей видимости, *Chloroflexi*. Предполагается, что в данном сообществе нитчатые формы *Chloroflexi* не только выступают в роли гетеротрофного компонента, но и выполняют функцию каркаса, обеспечивая формирование структуры биоплёнки. Показано, что дальнейший рост биоплёнок обуславливается увеличением количества входящих в них микробных клеток и накоплением внеклеточного полимерного матрикса полисахаридной природы. Биоплёнки возрастом 80-90 сут - зрелые, сравнительно крупные агрегаты, включающие собранные в кластеры коккоидные клетки, по-видимому, анаммокс-бактерий, и нитчатые формы значительной протяжённости (более 100 мкм). Изображения микрорельефа поверхности таких биоплёнок были получены с использованием атомно-силовой микроскопии. По данным флуоресцентной микроскопии с применением дифференциальных красителей (SYTO 9-пропидиум иодид), на этом этапе биоплёнка состоит преимущественно из живых клеток, мёртвые клетки единичны.

8.8. РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП АЦИДОФИЛЬНЫХ УМЕРЕННО ТЕРМОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ОКИСЛЕНИИ ПИРИТА

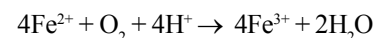
Булаев А.Г.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва
bulaev.inmi@yandex.ru

Биоокисление сульфидных руд ацидофильными микроорганизмами успешно применяется в металлургической промышленности для получения цветных и благородных металлов. Наиболее эффективны эти процессы при температурах, оптимальных для умеренных термофилов (40-45°C), где доминируют бактерии *Sulfobacillus* spp., *Acidithiobacillus caldus* и археи семейства *Ferroplasmaceae* (pp. *Ferroplasma* и *Acidiplasma*). Конкретная роль различных групп микроорганизмов, доминирующих в процессах биовыщелачивания, в окислении различных сульфидных минералов остается до конца непонятой. В рамках нашей работы на примере штаммов микроорганизмов, окисляющих железо и серу, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* VKMV-1269^T и *Acidiplasma* sp. MBA-1 была изучена роль различных групп ацидофильных микроорганизмов в окислении наиболее распространенного сульфидного минерала пирита. Пирит окисляется посредством косвенного механизма трехвалентным железом:



Микроорганизмы, в свою очередь, окисляют двухвалентное железо до трехвалентного:



Было проведено сравнение скорости окисления пирита сообществом ацидофильных микроорганизмов (*S. thermosulfidooxidans* VKMV 1269^T, *A. caldus* MBC-1, *Acidiplasma* sp. MBA-1) и чистыми культурами штаммов *S. thermosulfidooxidans* VKMV-1269^T и *Acidiplasma* sp. MBA-1. Эксперимент проводили в колбах Эрленмейера со 100 мл жидкой среды с начальным pH 1,5, дополненной 0,02% ДЭ и 1 г пирита. Об окислении пирита судили по концентрации железа в среде. Было установлено, что окисление минерала чистой культурой *S. thermosulfidooxidans* VKMV-1269^T и сообществом микроорганизмов происходило примерно с одинаковой скоростью, в то время как штамм *Acidiplasma* sp. MBA-1 окислял железо значительно медленнее (концентрации железа в среде после окисления пирита в течение 20 суток чистой культурой *S. thermosulfidooxidans* VKMV-1269^T и сообществом микроорганизмов достигали примерно 2 г/л, а при окислении штаммом *Acidiplasma* sp. MBA-1 - 1,2 г/л). Это может свидетельствовать о более важной роли штаммов *Sulfobacillus* spp. в биоокислении минерального сырья, содержащего пирит.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-31210 мол_а.

8.9. ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДМОНООКСИГЕНАЗ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГРИБНЫХ ЦЕЛЛЮЛАЗ

Булахов А.Г., Гусаков А.В.

Институт биохимии им А.Н. Баха РАН, лаборатория биотехнологии ферментов, Москва

Электронный адрес: alexbulakhov@yahoo.com

Недавно было обнаружено, что металлозависимые полисахаридмонооксигеназы (ПМО) являются важными компонентами ферментных комплексов, продуцируемых микроскопическими грибами. ПМО осуществляют окислительную деструкцию целлюлозы по радикальному механизму. Для их функционирования требуется наличие донора электронов. Сам по себе фермент не способен к глубокой деструкции целлюлозы, но существенно увеличивает эффективность целлюлаз, как было показано в литературе и исследованиях нашей лаборатории. Целью данной работы явилось определение оптимальных условий ферментативной деструкции целлюлозосодержащего сырья смесью целлюлаз и ПМО.

В работе использовали целлюлазный ферментный препарат на основе гриба *Penicillium verruculosum*, а также очищенные рекомбинантные ПМО из *Thielavia terrestris* и *Trichoderma reesei*, клонированные в *P. verruculosum*. В качестве субстратов использовали микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) и измельченную осиновою древесину (100 г/л). Ферментативный гидролиз проводили при pH 5,0 и 50°C в течение 48 ч. В качестве донора электронов использовали 5 мМ галлиевую кислоту (ГК).

В результате было выяснено, что наибольший выход глюкозы при гидролизе целлюлозных субстратов обеспечивает 10%-ная добавка ПМО (по концентрации белка) к целлюлазному препарату. Так, при гидролизе МКЦ смесью целлюлаз и ПМО из *T. terrestris* выход глюкозы достигал 30 г/л, а в случае добавки ПМО из *T. reesei* - 32 г/л, что было на 16 и 21% выше, чем в случае гидролиза МКЦ целлюлазным комплексом в отсутствие ПМО. При гидролизе осиновою древесины выход глюкозы достигал 35 г/л, а относительный прирост составил 13 и 17%, соответственно. Далее проводили изучение влияния концентрации донора электронов на гидролиз МКЦ. При этом в реакционную смесь сразу добавляли 100 мМ либо 50 мМ ГК или же вводили по 4 мМ ГК каждые 12 ч. Наибольший прирост выхода сахаров достигался при многократном введении в реакционную смесь малых количеств донора электронов. В случае ПМО *T. terrestris* выход глюкозы составил 32 г/л, а для ПМО *T. reesei* - 33 г/л, что соответствовало увеличению эффективности гидролиза на 21 и 23% по сравнению с целлюлазным комплексом без ПМО.

8.10. ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ПЕПТИДА UBI₁₈₋₃₅ В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ

Бурлакова Д.О.¹, Першина А.Г.^{1,2}, Сазонов А.Э.²

¹ Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск

² Сибирский государственный медицинский университет, Томск
Электронный адрес: d.o.burlakova@gmail.com

Перспективность использования радиоактивно меченых пептидов в биомедицинской диагностике обусловлена их высокой специфичностью к мишени и низкой токсичностью для организма; пептиды имеют меньшие размеры по сравнению с белками и проявляют низкую иммуногенность (G.L. Bidwell, 2012; M. Fani, 2012). Так с использованием антимикробных пептидов (АМП) - производных убиквицина, предложен эффективный подход к специфической индикации очагов гнойного воспаления у больных (M.S. Akhtar, 2005). В настоящее время пептиды получают преимущественно методом химического синтеза. Данный метод рационален на этапе поиска новых пептидов с высокой специфичностью к мишени, однако, для масштабирования процесса наработки пептида с целью создания диагностических систем выгодной альтернативой является микробный синтез с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Для успешной реализации данного подхода необходимо избежать риска протеолитической деградации пептида внутри микробной клетки и реализации негативных эффектов пептида в отношении клетки-продуцента. Целью данной работы было получить вектор для экспрессии АМП UBI₁₈₋₃₅ и оптимизировать условия экспрессии пептида в клетках *E. coli*.

Для клонирования использовали плазмиду pET31b+ (Novagen) и штамм *E. coli* XL-blue. Получение кодирующей пептид последовательности проводили методом ПЦР с использованием пары олигонуклеотидов (ЗАО Биосинтез) с областью перекрывания 20 н.о. Клонирование проводили по стандартным протоколам, рестрикцию, дефосфорилирование - согласно инструкции фирмы-производителя (СибЭнзим), выделение и очистку ДНК - стандартными наборами (Evrogen). Соответствие клонированной последовательности ДНК ожидаемой подтверждали методом секвенирования с T7 праймерами (ABI 3130XL, Applied Biosystems). Целевой пептид в составе белка-слияния с кетостероидомэразой (KSI) экспрессировали в штамме *E. coli* Rossetta DE3 pLysS при варьировании температуры от 25 до 37°C и концентрации ИПТГ от 0.1 мМ до 1 мМ. Визуализацию и количественную оценку пептида в составе белка-слияния проводили методом SDS-PAGE электрофореза (Laemmli, 1970). Вестерн-блот проводили с антителами Anti-His6-Peroxidase (Roche) и последующей хемилуминесцентной регистрацией ChemiFast (Syngene). Успешное клонирование пептида UBI₁₈₋₃₅ было достигнуто при условии дублирования вставки (в исходной синтетической последовательности). Оптимальные условия индукции экспрессии UBI₁₈₋₃₅-KSI достигали при 0.5 мМ ИПТГ, 28°C.

8.11. СИСТЕМА СБЛИЖЕННЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА "СЛОЖНЫХ" БИООБЪЕКТОВ МЕТОДОМ ПЦР

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

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

Исследования на уровне нуклеиновых кислот (НК), помимо собственно молекулярной биологии, стали уже рутинной практикой в селекции, таксономии, оценке и сохранении биоразнообразия, эволюции, изучении генетических основ регуляции физиологических процессов и устойчивости к биотическим и абиотическим факторам среды, биотехнологии, биоинженерии и др. Достигнутый современный методический уровень делает возможным анализ специфических последовательностей НК. Однако существующие на сегодня методы/инструменты молекулярной биологии не позволяют достаточно эффективно изучать "сложные" биологические объекты, такие как разрушенная ДНК ("древняя", выделенная из ископаемых останков, из объектов, подвергнувшихся физическим и химическим воздействиям окружающей среды).

Учитывая сложность и порой даже невозможность анализа подобных материалов с помощью имеющихся методов молекулярной биологии, мы изучили подход, основанный на использовании системы сближенных олигонуклеотидных праймеров. К одному прямому праймеру (*jF*) были подобраны четыре обратных (*jR1*, *jR2*, *jR3*, *jR4*), равноудаленных от прямого. В паре *jF-jR1* праймеры расположены "встык", т.е. их 3'-концы отжигаются на смежных нуклеотидах матрицы. Длина ампликонов данной пары составляет всего 38 п.н. Праймер *jR2* удален от *jF* на длину праймера *jR1*, длина ампликонов пары *jF-jR2* составляет 55 п.н. Соответственно каждый следующий обратный праймер (*jR3*, *jR4*) расположен от прямого на удалении, равном сумме длин предыдущих праймеров. Длины ампликонов третьего и четвертого обратных праймеров составляют 75 и 99 п.н., соответственно. На генетическом материале, выделенном из различных биообъектов (почва, труха) показано, что сближенное расположение прямого и обратного праймеров относительно друг друга обеспечивают эффективную амплификацию коротких ДНК-матриц при сохранении ее специфичности, в то время как использование стандартных праймеров, дающих продукты амплификации свыше 200 п.н., не приводит к образованию специфических ампликонов.

8.12. ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ МУТАНТОВ ЭНДО-1,4-β-КСИЛАЗЫ *PENICILLIUM CANESCENS*

Денисенко Ю.А., Гусаков А.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О.

Институт биохимии им А.Н. Баха РАН, Москва
Электронный адрес: denisenkojura@mail.ru

В состав клеточных стенок растений входят целлюлоза, гемицеллюлозы, пектины, лигнин, белки, а также органические вещества и минеральные элементы. Гемицеллюлозами называется большая группа щелочерастворимых полисахаридов растений, мономерами которых являются ксилоза, арабиноза, манноза, глюкоза, галактоза, фукоза. К числу гемицеллюлоз относятся ксиланы, ксилоглюканы, маннаны, галактаны и др. Эндо-1,4-β-ксилазы (далее ксиланазы) катализируют неупорядоченное расщепление β-1,4-ксилозидных связей в ксиланах и являются важным компонентом ферментных комплексов, применяемых в целлюлозно-бумажной промышленности, а также в хлебопечении и в качестве добавок к кормам сельскохозяйственных животных и птиц.

В целях поиска мутантных форм ксиланазы *Penicillium canescens* с увеличенной термостабильностью методом сайт-направленного мутагенеза нами были произведены четыре аминокислотные замены в ферменте: L18F, T104E, T160D, H191R. Полученные векторы были клонированы в *Penicillium verruculosum* под контролем промотора гена *cbh1*. Мутантные формы фермента T104E и T160D не экспрессировались, а две другие мутантные ксиланазы были выделены из соответствующих ферментных препаратов в гомогенном виде (по данным ПААГ-электрофореза) с помощью последовательных стадий хроматографического разделения. Для идентификации аминокислотных замен использовали МАЛДИ масс-спектрометрию. Исследование таких параметров, как каталитическая активность, температурная и рН зависимости активности, термостабильность при различных температурах показало, что обе мутации не привели к значительным изменениям свойств, за исключением термостабильности. Изучение термостабильности ферментов при 50, 55 и 60°C показало, что время полуинактивации мутанта L18F увеличилось по сравнению с нативным ферментом в 1,6, 1,8 и 2,2 раз, соответственно. В то же время замена H191R привела к некоторой дестабилизации фермента. Температуры фазового перехода гомогенных ксиланаз, полученные методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии, составили 56,1; 54,7 и 60,0°C для нативной ксиланазы, мутанта H191R и мутанта L18F соответственно.

Таким образом, аминокислотная замена L18F в эндо-1,4-β-ксилазе из *Penicillium canescens* привела к значительному увеличению термостабильности фермента.

8.13. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КСИЛАНАЗ БАКТЕРИИ *MELIORIBACTER ROSEUS* P3M-2

Ермакова А.Я., Ракитин А.Л.

Центр "Биоинженерия" РАН, Москва

Электронный адрес: alex.ermakova@mail.ru

Термофильная факультативно анаэробная органотрофная бактерия *Melioribacter roseus* P3M-2 была выделена из микробного мата в месте выхода подземных термальных вод (Podosokorskaya et al., Environ. Microbiol., 2013). Температура роста *M.roseus* составляет 35-60°C, pH от 6 до 8.7, субстратом являются различные полисахариды, в том числе целлюлоза, ксилан, декстран, лихенан, крахмал и агароза. В геноме *M.roseus* имеется набор генов, кодирующих гликозил-гидролазы различных семейств (Kadnikov et al., 2013, PLoS ONE 8(1): e53047).

В результате анализа геномных данных бактерии *M.roseus* были обнаружены гены эндоксилаза *xyl2090* (Mros_2090), *xyl2091* (Mros_2091) и *xyl2495* (Mros_2495). Согласно базе данных CAZy, ксиланазы *Xyl2090* и *Xyl2495* принадлежат семейству гликозил-гидролаз GH10, *Xyl2091* к семейству GH30. Для изучения функциональных характеристик гены эндоксилаза клонировали в векторе pQE30. Полученные плазмиды переносили в клетки *Escherichia coli* DLT1270 для экспрессии рекомбинантных белков. Эндоксилазы проявляют активность относительно березового ксилана, но не гидролизуют ксилобиозу, микрокристаллическую и карбоксиметил целлюлозу. Активность *Xyl2495* при гидролизе ксилана в оптимальных условиях (40°C, pH 6.5) составляет 1920 ед/мкг. Эндоксилазы *Xyl2090* и *Xyl2091* не проявляют такой повышенной активности, но обладают более высокими значениями оптимальной температуры 80°C и 65°C, соответственно. По результатам анализа продуктов гидролиза субстрата установлено, что эндоксилаза *Xyl2090* расщепляет ксилан до ксилоолигосахаридов, имеющих длину более пяти звеньев. В процессе гидролиза ксилана ферментами *Xyl2090* и *Xyl2495* образуются различные ксилоолигосахариды, однако конечными продуктами реакции являются ксилоза и ксилобиоза. Таким образом, эффективный гидролиз ксилана при высоких температурах возможен при совместном действии ксиланаз *Xyl2090* и *Xyl2091*. Охарактеризованные ферменты могут быть использованы для гидролиза лигноцеллюлозы при получении биоэтанола, в целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности.

8.14. ПОВЫШЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА К ФИТОПАТОГЕНАМ, ОБУСЛОВЛЕННАЯ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА АРЕНИЦИНА-2

Захарченко Н.С.¹, Доктюшов Е.В.², Мельникова Д.Н.², Финкина Е.И.²,
Баландин С.В.², Фурс О.В.^{1,2}, Обчинникова Т.В.², Бурьянов Я.И.¹

¹ Филиал Института биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: zhenyaloktushov@mail.ru

Антимикробные пептиды (АМП) обнаружены у всех эукариот, в том числе и у растений. АМП являются частью врожденной иммунной системы и проявляют антибиотическую активность в отношении различных патогенных микроорганизмов. Перспективной стратегией повышения устойчивости растений к инфекционным заболеваниям является создание трансгенных растений, несущих гены АМП.

Антимикробный пептид ареницин-2, выделенный из морского червя *Arenicola marina*, обладает широким спектром антимикробного действия и эффективно подавляет рост и размножение разнообразных грибов и бактерий. В данной работе были получены растения табака *Nicotiana tabacum*, несущие ген ареницина-2. Для этого ген *ar2* был клонирован в бинарный вектор pSS. В результате трансформации компетентных клеток *Escherichia coli* DH10b получены клоны, несущие рекомбинантную плазмиду pSS-Met-*ar2*. С геном ареницина-2 вектор pSS-Met-*ar2* переносили в клетки *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90RK). Один из клонов использовали для трансформации растений табака. Регенерация побегов была проведена на селективной среде MS. Наличие в геноме растений гена *ar2* было подтверждено методом ПЦР. Экспрессия гена *ar2* в линиях трансгенных растений была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР. Для оценки относительного уровня представленности транскриптов ареницина в линиях трансгенного табака и выявления линий с наибольшей экспрессией ареницина использовали ПЦР в реальном времени. В качестве референсного гена был выбран стабильно экспрессирующийся ген фактора элонгации *ef1*. Этот ген клонировали в pAL2-T векторе и определяли эффективность ПЦР в реакционных смесях с серийными разведениями матрицы. В случае целевого гена *ar2* эффективность ПЦР оценивали таким же образом, используя в качестве матрицы вектор pSS-Met-*ar2*. Было показано, что трансгенные растения характеризуются повышенной устойчивостью к заражению фитопатогенными микроорганизмами, а экстракты трансгенных растений табака обладают антибактериальной активностью. Наиболее выраженная антибактериальная активность соответствовала экстрактам линий трансгенного табака, в которых наблюдался наибольший уровень экспрессии гена ареницина.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 13-04-00636.

8.15. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВВЕДЕНИЯ ВЫСОКИХ ДОЗ НАНОЧАСТИЦ НА ИХ ФАРМАКОКИНЕТИКУ

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

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

² Московский физико-технический институт (Государственный университет)

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

Электронный адрес: ivan.zelepukin@gmail.com

В настоящее время различные наночастицы находят широкое применение в медицине и биологии, в частности для визуализации опухолей, создания диагностических систем различных заболеваний и таргетной доставки лекарственных средств. Однако, часто наночастицы, обладающие перспективными физико-химическими свойствами, не обладают наилучшими фармакокинетическими параметрами. Одним из важнейших параметров наночастиц является время их циркуляции в кровотоке животного.

Для получения и анализа фармакокинетических параметров наночастиц нами была использована оригинальная система детекции нелинейных магнитных материалов, основанной на регистрации отклика, возникающего при их перемагничивании в переменном магнитном поле, генерируемом на двух частотах. Данный метод является строго количественным и позволяет получать при комнатной температуре кривые выведения суперпарамагнитных наночастиц из кровотока животного с временным разрешением 3 с.

Нами было изучено, как различные физико-химические свойства наночастиц (например, размер наноагента и свойства его поверхности) влияют на время полувыведения препарата из кровотока мыши. Кроме того, было показано, что предварительное введение высоких доз частиц приводит к существенному увеличению времени циркуляции малых доз препарата. Данный эффект не являлся следствием уменьшения количества опсонированных в кровотоке, а был связан с частичной блокировкой макрофагальной системы наночастицами. Мы продемонстрировали, что блокировка макрофагов является обратимой и через 5 дней после введения высокой дозы наночастиц фагоцитирующая активность клеток организма возвращается к нормальному уровню.

Полученные данные могут быть использованы для увеличения продолжительности циркуляции наноагентов в кровотоке животного и улучшению их применений *in vivo*.

8.16. РАЗРАБОТКА МЕТОДА КЛЕТОЧНОГО ДИСПЛЕЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИСКУССТВЕННЫХ ФНО-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

Злобинов А.В.^{1,2}, Петровская Л.Е.¹, Шингарова Л.Н.¹, Долгих Д.А.^{1,2}

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

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

Электронный адрес: alexander.zlobionv@gmail.com

Фактор некроза опухолей человека (ФНО) является многофункциональным провоспалительным цитокином, играющим важную роль в развитии ревматоидного артрита, псориаза, болезни Крона и других заболеваний. В связи с этим конструирование ФНО-связывающих белков для снижения уровня этого цитокина в организме при патологических состояниях представляет собой актуальную задачу биоинженерии.

Ранее нами была создана комбинаторная библиотека генов на основе 10 домена фибронектина (¹⁰F_n3) и проведена селекция белков, связывающих биотинилированный ФНО методом CIS-дисплея. Для селекции вариантов, обладающих способностью к эффективному фолдингу в клетках *E. coli*, полученная библиотека была отобрана с помощью метода бактериального дисплея. С этой целью разработана уникальная система экспрессии, позволяющая экспонировать различные белки на поверхности бактериальных клеток в виде гибридов с трансмембранным доменом нового представителя семейства аутопереносчиков - аутопереносителя эстеразы *Psychrobacter cryohalolentis* (AT_Pc).

Сконструирована библиотека рекомбинантных генов, содержащих замены эстеразного домена AT_Pc на комбинаторную библиотеку генов на основе ¹⁰F_n3, отобранную с помощью CIS-дисплея. Проведен отбор клонов, содержащих ФНО-связывающие варианты ¹⁰F_n3, с использованием биотинилированного ФНО и Dynabeads M-280 Streptavidin. Отобранная библиотека переклонирована в экспрессионную плазмиду pET32a и трансформирована в клетки *E. coli* для индукции биосинтеза рекомбинантных белков. Полученные таким образом варианты ¹⁰F_n3 протестированы на наличие аффинности к ФНО с помощью иммуоферментного анализа. Варианты ¹⁰F_n3, показавшие наибольшую степень связывания с ФНО, были получены в препаративных количествах с помощью бактериальной системы экспрессии, физико-химические свойства полученных вариантов исследуются.

Работа проводилась при финансовой поддержке гранта РФФИ № 13-04-12405офи_м, НШ-1766.2014.4 и программы РАН "Молекулярная и клеточная биология".

8.17. БИОИНЖЕНЕРИЯ УКОРОЧЕННЫХ АНАЛОГОВ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АРЕНИЦИНА

Иванова Ю.Д., Пантелеев П.В., Болосов И.А., Баландин С.В.,
Овчинникова Т.В.

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

Стремительное распространение возбудителей бактериальных инфекций, резистентных ко многим существующим антибиотикам, делает актуальной разработку новых лекарственных средств, обладающих принципиально иными механизмами действия. В последние годы все больший интерес привлекают препараты на основе антимикробных пептидов (АМП), способных решить проблему резистентности и благодаря своим уникальным свойствам составить конкуренцию применяемым в настоящее время антибиотикам.

АМП являются неотъемлемой частью системы врожденного иммунитета многих организмов. Данные соединения активны в отношении широкого спектра болезнетворных организмов: от вирусов до круглых червей. Одним из наиболее активных классов природных АМП являются β -спилечные пептиды, стабилизированные дисульфидными связями. Вместе с тем, эти молекулы проявляют токсичность в отношении нормальных клеток млекопитающих, что является препятствием для их применения в качестве лекарственных средств. В связи с этим основная работа ведется над созданием АМП с повышенным терапевтическим индексом (ТИ), т.е. биологически активных веществ со сниженной токсичностью. В настоящее время существует несколько подходов к созданию терапевтически ценных аналогов АМП на основе высокоактивных природных соединений: изменение суммарного заряда, гидрофобности, амфифильности, жесткости вторичной структуры АМП. В ряде исследований как α -спиральных, так и β -спилечных АМП было показано, что укороченные аналоги обладают более высокими значениями ТИ по сравнению с исходными молекулами.

В данной работе с помощью методов направленного мутагенеза и гетерологической экспрессии в бактериальной системе был получен ряд укороченных аналогов β -спилечного АМП ареницина из полихеты *Arenicola marina*. В ходе работы были изучены антибактериальные и гемолитические свойства полученных соединений, а также проанализирована зависимость этих свойств от особенностей структуры пептидов.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МК-6023.2014.4).

8.18. ДИЗАЙН И КОНСТРУИРОВАНИЕ ИСКУССТВЕННОГО ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО ПОЛИЭПИТОПНЫЙ ПОЛИПЕПТИД, СОСТОЯЩИЙ ИЗ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ИМУНОДОМИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ДОЛИНЫ РИФТ

Иматдинов И.Р., Балышева В.И.

ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН, Покров,
Владимирская обл.

Электронный адрес: ilnazlcf@ya.ru

Лихорадка долины Рифт (ЛДР) - зооантропонозная вирусная инфекция, распространенная в ряде стран Африки и Ближнего Востока. К ЛДР восприимчивы многие виды диких и домашних животных, а также человек. В настоящее время приоритетным направлением разработки средств специфической защиты от ЛДР является конструирование генно-инженерных вакцин. Одними из перспективных кандидатов являются ДНК-вакцины, кодирующие соответствующий целевой белок. Иммунизация плазмидной ДНК, содержащей открытую рамку считывания с соответствующими эукариотическими сигнальными элементами, приводит к синтезу белков *in vivo*, конформационные и посттрансляционные модификации которых идентичны синтезируемым при инфекционном процессе.

На основе литературных данных и компьютерного анализа аминокислотных последовательностей гликопротеинов Gn, Gc и нуклеопротеина N были определены последовательности прогнозируемых протективных антигенных детерминант белков [EpiPred, Imatdinov I.R., 2012]. Выбранные участки использовали при компьютерном дизайне искусственного полиэпитопного белка [RaptorX, <http://raptorx.uchicago.edu>; I-TASSER, <http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER>]. В результате составлена аминокислотная последовательность полипептида варианта "S73", включающего T- и B-эпитопы. Также клонированы гены, кодирующие гликопротеины Gn и Gc, под контролем цитомегаловирусного промотора для сравнительной оценки иммунного ответа на введение рекомбинантных плазмид.

8.19. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АРЕНИЦИНА-2 НА АКТИВНОСТЬ КОНВЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИБИОТИКОВ ПРИ ИХ СОВМЕСТНОМ ПРИМЕНЕНИИ

Калашиников А.А., Болосов И.А., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: kalash23rus@mail.ru

В связи с широким применением антибиотиков распространение патогенных микроорганизмов, резистентных к антимикробным препаратам, стало приобретать массовый характер. Из-за этого антибиотики, которые ещё недавно успешно использовались для борьбы с возбудителями инфекционных заболеваний, теперь теряют свою эффективность. В частности, это касается оппортунистических инфекций и возникающей у них невосприимчивости к классическим антибиотикам. Одним из путей повышения эффективности антибиотических препаратов является создание условий для успешного преодоления антибиотиком барьера цитоплазматической мембраны клетки микроорганизма и, как следствие, обеспечение доступности клеточных мишеней для антибиотического препарата. Такой эффект может быть достигнут при совместном применении антимикробных пептидов (АМП) и традиционных антибиотических средств, обладающих различным механизмом действия.

За последнее время в результате непрекращающихся поисков было открыто множество антимикробных пептидов (АМП), выделенных из животных, растений и микроорганизмов. Особый интерес представляет группа катионных β -спилечных АМП, структура которых стабилизирована дисульфидными связями. Такое строение пептидов придаёт им не только выраженную антимикробную активность, но и высокую устойчивость к протеазам.

В ходе работы было исследовано совместное антимикробное действие β -спилечного АМП ареницина-2 и шести конвенциональных антибиотиков, относящихся к различным структурным группам (ампициллин, тетрациклин, стрептомицин, хлорамфеникол, рифампицин и полимиксин В). В качестве тест-культур использовались бактерии *Escherichia coli* C600, *Staphylococcus aureus* 209p и *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Минимальные ингибирующие концентрации (MIC) определяли методом двойных серийных разведений в жидкой среде. Оценку синергического эффекта проводили путем вычисления индекса долевых ингибирующих концентраций (FICI). $FICI = [A]/MIC_A + [B]/MIC_B$, где MIC_A и MIC_B - минимальные ингибирующие концентрации для индивидуальных веществ, а $[A]$ и $[B]$ - минимальные ингибирующие концентрации при совместном применении. Значение FICI < 0.5 показывает, что вещества проявляют синергизм. В ходе работы было показано наличие синергического эффекта при совместном применении ареницина-2 и некоторых конвенциональных антибиотиков (полимиксина В на тест-культуре *E. coli*; тетрациклина и рифампицина на тест-культуре *St. aureus*; ампициллина, стрептомицина, хлорамфеникола и полимиксина В на тест-культуре *Ps. aeruginosa*). Наиболее ярко синергический эффект проявлялся в тестах на культуре *St. aureus*.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (соглашение № 14-14-01036).

8.20. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАГОВЫХ МИНИАНТИТЕЛ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Sp245 МЕТОДОМ ЭЛЕКТРООПТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Караваева О.А.¹, Гулий О.И.¹, Дыкман Л.А.¹, Староверов С.А.¹, Фомин А.С.¹, Павлий С.А.¹, Бунин В.Д.², Игнатов О.В.¹

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

² Elosystems GbR, Berlin, Germany

Электронный адрес: helga1121@yandex.ru

Традиционно биологическими компонентами, используемыми для специфической детекции клеток, являются поликлональные и моноклональные антитела (Ат), которые широко применяются в производстве диагностических тест-систем. В последнее время для решения подобных задач в молекулярной биологии стали использоваться генно-инженерные технологии клонирования узнающих фрагментов - гипервариабельных участков иммуноглобулинов, которые являются более дешевыми и могут конкурировать по селективности с гибридомными технологиями. К такому методу относится технология фагового дисплея, созданная Дж. Смитом. Ат, полученные с помощью технологии фагового дисплея, успешно используются для идентификации бактерий. Цель исследований заключалась в получении рекомбинантных фаговых Ат на поверхностные антигены типового штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 с использованием комбинаторной фаговой библиотеки овцы, а также их применение при анализе поверхностных антигенов и детекции клеток с помощью метода электрооптического (ЭО) анализа клеточных суспензий. Нами были получены фаговые мини-антитела к липополисахариду (ЛПС) и флагеллину клеток *A. brasilense* штамма Sp245 с использованием комбинаторной фаговой библиотеки. Полученные фаговые Ат были использованы для определения ЛПС и флагеллина методами дот-анализа и методом ЭО анализа клеточных суспензий. Показано, что при взаимодействии клеток *A. brasilense* Sp245 с фаговыми Ат на ЛПС и на флагеллин происходило значительное изменение величины ЭО сигнала. Одновременно проводилась электронная микроскопия взаимодействия клеток *A. brasilense* Sp245 с фаговыми Ат на ЛПС и флагеллин. Результаты электронной микроскопии подтвердили взаимодействие анти-ЛПС фаговые Ат с клетками данного штамма, при этом фаговые Ат распознавали только один вид детерминант - терминальные участки О-специфических полисахаридов ЛПС. Результаты электронной микроскопии демонстрируют одиночные метки на полярном жгутике при использовании анти-флагеллиновых фаговых Ат. Мы полагаем, что полученные результаты могут быть использованы для создания быстрого теста детекции микробных клеток и оценки экспонированности тех или иных антигенных детерминант в составе клеточной поверхности бактерий.

8.21. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* СЕРОГРУППЫ I С СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫМИ РАСТЕНИЯМИ

Ковтунев Е.А., Филиппчева Ю.А., Шелудько А.В., Шумилова Е.М., Петрова Л.П.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
Саратов

Электронный адрес: kovtunovea@mail.ru

Свободноживущие, азотфиксирующие, стимулирующие рост растений ризобактерии *Azospirillum brasilense* обитают в ризосфере различных трав и зерновых культур, произрастающих по всему миру. Важную роль в микробно-растительных взаимодействиях играют высокомолекулярные вещества, локализованные на поверхности азоспирилл, в том числе липополисахариды (ЛПС). Присутствие в структуре О-специфического полисахарида ЛПС бактерий ряда штаммов *A. brasilense* D-рамнозы позволило объединить их в серогруппу I. Объектами нашего исследования были штамм *A. brasilense* Sp245, выделенный из корней пшеницы в Бразилии, и штаммы SR75 и SR15, выделенные в Саратовской области из проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. cv. Саратовская 29 и ежи сборной, соответственно. Предварительно был проведен биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей плазмид *A. brasilense* Sp245 с целью выявления генов, кодирующих ферменты, участвующие в синтезе ОПС. ПЦР-скрининг подтвердил предположение о большом сходстве в организации генов, участвующих в биосинтезе ОПС штаммов Sp245, SR75 и SR15.

Исследование физиологической активности этих бактерий *in vitro* и *in situ* в отношении проростков пшеницы и кукурузы показало наличие ростстимулирующего эффекта использованных штаммов.

Возможно, ростстимулирующий эффект в отношении растений обусловлен, помимо прочих факторов, физико-химической структурой ЛПС азоспирилл. По нашим наблюдениям проявляющаяся в изменении морфологии корневых волосков и уровня активности растительной пероксидазы ответная реакция проростков пшеницы на присутствие азоспирилл согласуется с физико-химическими свойствами ЛПС. Происходящие в корневой системе морфологические изменения в ответ на инокуляцию азоспириллами в целом приводят к увеличению площади корневой поверхности, что позитивно отражается на росте и развитии всего растения.

Работа поддержана грантом РФФИ №13-04-01276-а.

8.22. ВЛИЯНИЕ МЕТАНА И ДВУОКИСИ УГЛЕРОДА НА РАБОТУ ФЕРМЕНТНОГО ЭЛЕКТРОДА НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕНАЗЫ

Кошкарлова Л.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва

Электронный адрес: Liliyakoshkarova@mail.ru

Водород является важным интермедиатом в природных микробных сообществах. Для изучения взаимодействия микроорганизмов между собой необходимо измерять концентрацию водорода непосредственно в среде культивирования. Большинство существующих на сегодняшний день водородных сенсоров не подходят для выполнения микробиологических задач. Чувствительный элемент большинства из них, изготавливаемый, как правило, на основе благородных металлов, даёт отклик на другие соединения, выделяемые микроорганизмами (например, метан), либо отравляется ими (сероводород или окись углерода). Альтернативным методом является использование электрохимических биосенсоров на основе фермента гидрогеназы, которая отвечает за поглощение и выделение водорода в клетках микроорганизмов. Гидрогеназа в таком случае выступает в качестве биоселектирующего агента, а электрод, на котором она иммобилизуется, является физическим преобразователем сигнала, трансформирующим концентрированный сигнал в электрический. Такой сенсор высокоспецифичен, т.е. даёт отклик только на водород, а его активность не ингибируется веществами, содержащимися в среде культивирования.

Чтобы подтвердить высокоспецифичность метода, были проведены исследования по влиянию на работу гидрогеназного электрода метана и двуокиси углерода, поскольку они являются одними из основных продуктов микробного метаболизма. Гидрогеназа, использованная в работе, была выделена из пурпурной фототрофной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS. Фермент иммобилизовали на углеродную ткань, модифицированную нейтральным красным. Было показано, что электрод не даёт положительного отклика на исследуемые газы, поскольку при положительных перенапряжениях фиксировали значительные токи окисления водорода, в то время как при замене барботируемого газа с водорода на метан либо двуокись углерода анодные токи не наблюдались. В последующих экспериментах при барботировании раствора смесью водорода и аргона регистрировали показания тока при разных значениях перенапряжения, затем заменяли в смеси аргон на исследуемый газ и проводили те же измерения. Углекислый газ вызывал небольшое снижение токов окисления водорода при невысоких значениях перенапряжения, в то время как метан не влиял на работу электрода. Таким образом, углекислый газ и метан не оказывают значительного влияния на работу гидрогеназного электрода, который в перспективе может быть использован как сенсор для определения концентрации водорода, производимого микробным сообществом.

8.23. ЛИГНИНДЕГРАДИРУЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПЕРОКСИДАЗ ФЕНОЛОКИСЛЯЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ЭНДОФИТНОЙ БАКТЕРИИ *A. BRASILENSE*

Куряшина М.А.¹, Петров С.В.², Никитина В.Е.¹

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

² Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

Электронный адрес: kurgyashina_m@mail.ru

В последнее время резко возрос интерес к ферментативно катализируемому синтезу. Ферментативный катализ является экологически обоснованным и не требует больших материальных затрат. Одними из наиболее перспективных являются исследования лигнин- и Mn-пероксидаз (ЛГП и MnП), субстратная специфичность данных ферментов позволяет вовлекать в реакции окисления широкий ряд ароматических соединений, включая орто- и парадиенолы, аминокислоты, полифенолы и лигниноподобные соединения. Относительно хорошо изучены пероксидазы лигнинолитических комплексов базидиальных грибов. Однако в научной литературе крайне фрагментарны сведения о ЛГП и MnП бактериального происхождения, кроме того полностью отсутствуют данные о способности данных ферментов к деградации сложных полифенольных веществ, в том числе лигнина.

В рамках данного исследования обнаружена лигнинолитическая активность у ассоциативной почвенной бактерии *A. brasilense* Sp245. Разработаны схемы выделения ЛГП и MnП из культуральной жидкости данного штамма. Получены и частично охарактеризованы электрофоретически гомогенные препараты внеклеточных ЛГП и MnП. Лигниндеградирующий потенциал выделенных ферментов был определен с помощью метода Ahmad (Ahmad et al., 2010), с использованием двух модельных препаратов лигнина Классона, полученных из нативных и метанолизных опилок. Обнаружено, что оба фермента способны окислять модельные соединения лигнина. Отмечено, что гомогенный препарат ЛГП в большей степени разрушал лигнин Классона. Исследование окисления препаратов нитрированного лигнина в динамике показало, что данные пероксидазы активнее окисляли модельные соединения, полученные из нативных опилок. При разрушении препарата лигнина Классона, полученного из модифицированных опилок, содержащих большое количество метоксильных групп, оба фермента проявляли схожую активность. Однако, при окислении немодифицированного препарата лигниндеградирующий потенциал ЛГП был на 58% выше по сравнению с MnП, что свидетельствует о способности ЛГП к деградации более сложных полифенольных структур.

Итак, в ходе данного исследования впервые обнаружена лигнинолитическая активность у бактерий рода *Azospirillum* и показана способность собственных ЛГП и MnП деградировать модельные соединения лигнина.

8.24. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ДИНАМИКУ РОСТА ПСИХРОФИЛЬНЫХ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Ламова Я.А., Князюк М.К.

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

Электронный адрес: lamova.yana@mail.ru

Экологическая нагрузка на водные экосистемы с каждым годом значительно возрастает, что, очевидно, связано с развитием шельфовой и глубоководной нефтедобычи. Наибольшее развитие этих областей наблюдается в арктическом регионе, что делает актуальной проблему очистки нефтяных загрязнений в условиях северного климата. Микробная биоремедиация, как метод утилизации нефтяных разливов, имеет высокий потенциал применения для решения данной проблемы. Поиск и исследование активных сообществ и штаммов аборигенных психрофильных углеводородоокисляющих микроорганизмов, а также оптимизация методов их культивирования способны в будущем сыграть большую роль в создании эффективных биопрепаратов для очистки арктического региона от нефтяных загрязнений.

Целью работы стало изучение динамики роста углеводородоокисляющих микроорганизмов в зависимости от объема внесенного инокулята и температурных условий культивирования (10°C, 4°C, -4°C). В работе использовались две накопительные культуры психрофильных углеводородоокисляющих микроорганизмов, выделенных из морской воды в окрестностях порта г. Владивостока. Первоначально был проведен посев накопительных культур на жидкую среду Тауссона с добавлением смеси товарной нефти и дизельного топлива (в соотношении 1:1) в концентрации 1%. Вносимый инокулят составлял 10, 1 и 0,1%. Для инкубирования флаконов было выбрано 3 режима температуры: 10°C, 4°C и -4°C. Определение титра осуществлялось методом подсчета КОЕ через 5 суток после посева на плотную среду (Plate Count Agar) при температуре инкубирования 10°C.

Результаты эксперимента были представлены в виде графиков, описывающих динамику роста микроорганизмов в заданных условиях. Как следует из данных, нами было доказано, что количество первоначально вносимого инокулята не влияет на конечный титр микроорганизмов. Также была показана возможность роста углеводородоокисляющих микроорганизмов при -4°C с увеличением титра более чем в 40 раз за 1 неделю культивирования.

Приведенные результаты позволяют сделать вывод о возможности применения выделенных психрофильных сообществ микроорганизмов для разработки биопрепаратов для очистки северных морских акваторий от нефтяных загрязнений, а также дают основание для дальнейшего исследования возможности утилизации компонентов нефти микроорганизмами на поверхности льда.

8.25. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО БИОИМИДЖИНГА ДЛЯ МОНИТОРИНГА ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОПУХОЛЕЙ В ПРОЦЕССЕ ИХ РОСТА

Лымарь Ю.Г., Казачкина Н.И., Жердева В.В.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва
Электронный адрес: julymoreva@gmail.ru

Апоптоз - один из видов программируемой клеточной гибели - играет важную роль в возникновении и прогрессировании онкологических заболеваний, а также реализации эффектов противо-опухолевых воздействий. Ключевым ферментом апоптоза является каспаза-3. Ранее был разработан сенсор каспазной активности, представляющий собой FRET-пару цветных белков TagRFP (донор) и KFP (акцептор), связанных между собой линкером с сайтом распознавания каспазы-3 (конструкция названа TR23K). В результате разрезания линкера ферментом нарушаются условия FRET, интенсивность и время жизни флуоресценции донора увеличиваются [1]. Целью настоящей работы является характеристика флуоресцентных свойств опухолей, полученных на основе клеток, TR23K и TagRFP для выбора условий эксперимента по визуализации активности каспазы-3 *in vivo*.

Материалы и методы. В работе использованы мыши nu/nu, самки, с опухолями человека А-549 (аденокарцинома легкого человека) и Her2 (эпидермоидная карцинома гортани человека). Клетки были трансдуцированы *in vitro* плазмидами, кодирующими сенсор TRK23K или белок TagRFP. Флуоресцентные исследования проводили *in vivo* методами планарного имиджинга: отражающего или с временным разрешением. Флуоресценцию возбуждали в диапазоне длин волн 502-547 нм.

Результаты. Флуоресценция опухолей А-549, экспрессирующих цветные белки, была ярче, и появлялась раньше, чем Her-2.

Показано, что в опухолях А-549 и Her-2, экспрессирующих TR23K, среднее время жизни флуоресценции колебалось в пределах 1,5 - 1,7 нсек.

При измерении *in vivo* среднее время жизни интенсивно флуоресцирующей опухоли А-549/TagRFP составляло 2,3-2,5 нсек, а более слабо флуоресцирующей Her-2/TagRFP - 1,8-1,9 нсек. Среднее время жизни флуоресценции опухолей Her-2, экспрессирующих TagRFP, измеренное после удаления кожи, составляло 2,2-2,5 нсек.

Таким образом, измерение *in vivo* позволяло отличить опухоли, экспрессирующие TR23K и TagRFP, по времени жизни флуоресценции. Влияние собственной флуоресценции сказывалось на определении среднего времени жизни флуоресценции слабо флуоресцирующих опухолей Her-2, экспрессирующих цветные белки. Это указывает, что при противоопухолевых воздействиях необходимо ориентироваться на изменение относительно первоначального уровня, а не на абсолютные значения времени жизни флуоресценции.

8.26. ДЕТЕКЦИЯ АГРЕГАТОВ ФУЛЛЕРЕНОВ C₆₀ И ВЫЗЫВАЕМЫХ ИМИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОРГАНАХ КРЫСЫ МЕТОДАМИ ТРАНСМИССИОННОЙ (ТЭМ) И АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ (анЭМ)

Масютин А.Г.¹, Ерохина М.В.¹, Шебанова А.С.¹, Шипелин В.А.², Смирнова Е.А.¹, Гмошинский И.В.², Онищенко Г.Е.¹

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

² НИИ питания РАМН, Москва

Электронный адрес: Squiggoth@yandex.ru

В связи с широчайшим применением в промышленности и медицине фуллерены C₆₀ являются одним из наиболее распространенных типов углеродных наночастиц, с которыми человек сталкивается в ходе жизнедеятельности. Поэтому изучение потенциальных рисков влияния C₆₀ на органы и ткани человека и млекопитающих представляется важной задачей. Введение суспензии наночастиц C₆₀ крысам линии Wistar проведено двумя способами: (1) хирургически, в изолированный участок тонкого кишечника (10 мг/кг, на 3 часа) и (2) внутривентриально (однократная инъекция 100 мг/кг, на 28 дней). Оценка влияния C₆₀ на клетки и ткани производилась методами ТЭМ; детекция наночастиц - спектроскопией характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ) и дифракцией электронов (ДЭ). Полученные результаты показали, что C₆₀ при первом способе введения: (а) не аккумулируются в энтероцитах и клетках печени; (б) не вызывают патологических изменений в энтероцитах; (в) в гепатоцитах вызывают накопление липидных капель, аутофагию и некротическую гибель. При внутривентриальном введении: (а) брыжейка содержит гигантские пласты фуллеренов C₆₀, разрушающих структуру клеток и ткани; (б) в печени и селезенке выявляются отдельные скопления C₆₀; (в) в печени имеются признаки некрозов и дезорганизации паренхимы. Природа агрегатов C₆₀ подтверждена методами СХПЭЭ и ДЭ. Наши результаты демонстрируют, что при прямом контакте детектируемые агрегаты C₆₀ не проникают в тонкий кишечник. В то же время C₆₀ или продукты их биотрансформации оказывают не прямое действие на гепатоциты, индуцируя патологические изменения. При внутривентриальном введении C₆₀ распространяются через кровь по всему организму, накапливаясь и длительно присутствуя в различных органах, вызывают развитие патологических изменений. Совместное использование ТЭМ и анЭМ позволяет провести комплексный анализ клеток и тканей, контактирующих с C₆₀, и демонстрируют, что распределение C₆₀ и индуцируемых ими патологических изменений зависит от дозы и способа введения наночастиц.

8.27. К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ ФОРМИРОВАНИЯ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ МИКРОЧАСТИЦ В ХОДЕ ПЦР: КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ ПИРОФОСФАТА МАГНИЯ

Мачулин А.В.¹, Данилевич В.Н.²

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино

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

Ранее описан феномен формирования ДНК-содержащих микро- и наночастиц (MPs и NPs) в процессе полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Данилевич, Петровская, Гришин, 2009). В настоящей работе мы исследовали роль пирофосфата (PPi) и катионов Mg²⁺ в формировании ДНК MPs в ходе ПЦР. Установлено, что PPi входит в состав MPs и наряду с катионами Mg²⁺ абсолютно необходим для их формирования. При добавлении в ПЦР смесь термостабильной пирофосфатазы *Tli* микрочастицы не образуются. Более того, в присутствии пирофосфатазы происходит частичная деструкция микрочастиц. Установлено, что при термоциклировании (в режиме ПЦР) водных и буферных растворов, содержащих Na-пирофосфат (NaPPi) и MgCl₂ (без ДНК-полимеразы), формируются два типа структур из Mg-пирофосфата - плоские микродиски и трехмерные (3D) MPs. При этом размеры микрочастиц зависят от концентрации Mg-пирофосфата и MgCl₂ и варьируют в пределах от 10 до 0.25 мкм. С помощью сканирующей электронной микроскопии (РЭМ) показано, что 3D MPs из неорганического Mg-пирофосфата состоят из различного числа пересекающихся дисков (сегментов дисков). По принципу строения (по своей морфологии) они схожи с MPs, которые нарабатываются в ходе ПЦР. Методом дифракции электронов установлено, что микродиски из неорганического Mg-пирофосфата и диски, образующиеся в ПЦР, дают сходные дифракционные картины и являются монокристаллами. Микрочастицы из Mg-пирофосфата могут включать в свой состав dNTPs, праймерные олигонуклеотиды и ДНК. При этом добавки вышеуказанных компонентов в раствор для термоциклирования усложняют и разнообразят морфологию образующихся MPs. Таким образом, необычная и сложная морфология ДНК MPs, образующихся в ходе ПЦР, детерминирована уникальным свойством Mg-пирофосфата - формировать надмолекулярные кристаллические структуры при термоциклировании. Полученные данные проливают свет на молекулярный механизм конденсации ДНК в ходе ПЦР. Мы предполагаем, что кристаллические структуры из Mg-пирофосфата служат матрицей для конденсации ДНК ампликона.

8.28. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ЭЛЕКТРОАКУСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК К БАКТЕРИОФАГАМ

Павлий С.А.¹, Гулий О.И.², Зайцев Б.Д.³, Шихабудинов А.М.³,
Караваяева О.А.², Коннова С.А.¹, Игнатов О.В.²

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

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

³ Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Саратов
Электронный адрес: sergeipavliy@mail.ru

Препараты бактериофагов имеют большие возможности для использования в качестве антибактериальной терапии. Для определения устойчивости микробных клеток к бактериофагам в большинстве случаев используют стандартные микробиологические методы, сущность которых заключается в том, что бактериальную культуру совместно с вирусами высевают на жидкие или плотные питательные среды. Такие методы являются довольно длительными и трудоемкими. Поэтому целью работы являлось изучение возможности использования метода электроакустического (ЭА) анализа для определения устойчивости микробных клеток к фаговой инфекции. В качестве модельных объектов использовали клетки *Escherichia coli* штаммов XL-1, TG-1, K12, B-878 и BL-Ril и бактериофаг M13K07, который обладает специфичностью в отношении мужских (F⁺) клеток *E. coli*. Измерения ЭА параметров микробных суспензий проводили с помощью резонатора с поперечным возбуждающим электрическим полем, с простейшей геометрией электродов, нанесенных на пластину ниобата лития X-среза, разработанного в лаборатории физической акустики Саратовского филиала Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова. Установлено, что специфические изменения ЭА параметров клеточных суспензий под действием фага M13K07 происходят только у микробных клеток *E. coli* штаммов XL-1, TG-1, K12, у суспензий клеток *E. coli* штаммов B-878 и BL-Ril значительных изменений ЭА параметров под действием фага не происходит. Проведены контрольные эксперименты инфицирования клеток бактериофагом с помощью стандартного посева на плотные питательные среды. Полученные результаты демонстрируют возможности применения метода ЭА анализа для определения устойчивости микробных клеток к бактериофагам.

8.29. СИНТЕЗ И ДЕЙСТВИЕ ЦИАНИДА И ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ НА МИКРООРГАНИЗМЫ, ДРОЗОФИЛУ, НЕМАТОДЫ

Попова А.А., Плюта В.А., Липасова В.А., Кокишарова О.А., Хмель И.А.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва
Электронный адрес: french@land.ru

Некоторые бактерии, ассоциированные с растениями, могут синтезировать летучие органические соединения (ЛОС), подавляющие рост фитопатогенных микроорганизмов. О природе ЛОС, продуцируемых различными бактериями, сведений имеется недостаточно, не изучены молекулярно-генетические и биохимические основы их действия и синтеза.

В ходе работы было показано, что летучие вещества, образуемые бактериями *Pseudomonas* и *Serratia*, подавляют рост фитопатогенных бактерий, грибов и цианобактерий *Synechococcus*.

ЛОС бактерий-продуцентов вызывают у нематоды *Caenorhabditis elegans* заметную задержку в развитии и сбой репродуктивной функции, а на дрозифилу *Drosophila melanogaster* оказывают летальный эффект.

Хромато-масс-спектрометрический анализ показал, что в наибольшем количестве синтезируются диметилдисульфид (ДМДС), а также ряд кетонов и алкенов. В ходе работы анализируется действие 2-нонанона, 2-гептанона, 1-ундецена, 2-ундеканона и ДМДС на различные организмы. ДМДС и кетоны подавляют рост бактерий, значительно ингибируют рост грибов *Rhizoctonia solani*. На *D. melanogaster* и *C. elegans* ЛОС эти соединения оказывают быстрый летальный эффект.

В смеси летучих веществ, синтезируемых почвенными бактериями, кроме органических, может содержаться неорганическое летучее соединение, оказывающее токсический эффект на различные организмы, включая бактерии и растения, - цианид (HCN). Поэтому была проведена работа по определению способности штаммов, синтезирующих ЛОС, продуцировать HCN. Было определено, что пять из исследованных штаммов *P. chlororaphis* синтезируют HCN, а у остальных штаммов *P. chlororaphis*, *S. proteamaculans*, *P. fluorescens* В-4117 и *S. plymuthica* практически полностью отсутствует синтез цианида. Все исследованные штаммы оказывают ингибиторное действие на прокариот и убивают *D. melanogaster* за счет действия выделяемых летучих веществ, вне зависимости от присутствия HCN. Это говорит о том, что HCN не влияет на ингибиторную способность летучих веществ, синтезируемых исследованными штаммами.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-00636.

8.30. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ ЭКСПРЕСС-МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Сережкин И.Н.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,
биологический факультет, Москва
Электронный адрес: serejkinilya@gmail.com

В связи с активным развитием морского транспорта и нефтедобывающей отрасли в арктическом регионе в последние годы ведутся разработки биопрепаратов для ликвидации разливов нефти на основе аборигенных психрофильных углеводородоокисляющих микроорганизмов. Однако методы их выделения отличаются трудоемкостью и низкой скоростью получения результата. Актуальной становится разработка экспресс-методов выделения углеводородоокисляющих микроорганизмов, которые будут пригодны для создания биопрепаратов для очистки морских акваторий.

В работе представлена новая методика выделения микроорганизмов, активных в отношении нефти. В качестве образцов использовали сообщества углеводородоокисляющих микроорганизмов, выделенных в прибрежных водах Белого и Баренцева морей, культивируемые в течение 8 месяцев на жидкой минимальной среде Таусона с добавлением 1% смеси товарной нефти и дизельного топлива (1:1) в качестве субстрата. Сутью разработанного метода является высев десятикратных разведений образцов на чашки Петри с плотной питательной средой (Plate count agar с добавлением минерального фона). После инкубации при 20°C до появления видимых колоний, поверхность агара покрывали стерильной фильтровальной бумагой, пропитанной смесью товарной нефти и дизельного топлива. После суточной инкубации чашки анализировали на наличие зон просветления фильтровальной бумаги над колониями углеводородоокисляющих микроорганизмов. Наличие просветлений фильтра являлось показателем ферментативной и эмульгирующей активности клеток.

Валидация метода была проведена параллельным высевом более 80 колоний активных в отношении нефти микроорганизмов на традиционные плотные диагностические среды для углеводородоокисляющих микроорганизмов (среда Таусона + 1% нефти, среда Таусона + 5% нефти + 0,1% раствора Tween-80). В результате было показано, что 32 активных в отношении нефти колонии, выделенные разработанным методом, не показали роста на традиционных диагностических средах. Проведенный эксперимент показывает, что разработанная методика позволяет выявить больше микроорганизмов, активных в отношении нефти, чем стандартные методики их выделения. Кроме того, описанная методика менее трудоемка и занимает значительно меньше времени вне зависимости от температуры инкубации посевов.

8.31. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД В СИСТЕМАТИКЕ ТОКСИГЕННЫХ ГРИБОВ-ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФУЗАРИОЗА ЗЕРНА

Стахеев А.А., Завриев С.К.

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

Фузариоз зерна является одним из наиболее опасных заболеваний сельскохозяйственных культур по всему миру, в том числе и в различных природно-географических зонах России. Заражение растений грибами рода *Fusarium* приводит к существенному снижению количества и качества урожая, а также к накоплению в зерне и продуктах его переработки микотоксинов, представляющих серьёзную угрозу для здоровья человека и животных. Актуальность изучения и выявления продуцентов микотоксинов признана во всём мире и является важнейшим аспектом продовольственной и биологической безопасности.

Род *Fusarium* сложен с точки зрения систематики и таксономической характеристики его представителей. Выделенный в отдельную таксономическую группу более двухсот лет назад, за это время принципы его классификации несколько раз претерпевали существенные изменения. На сегодняшний день развитие методов молекулярного маркирования, основанных на полимеразной цепной реакции и секвенировании ДНК, позволило внести некоторую ясность и установить таксономический статус многих представителей рода. Тем не менее, объём генетических данных для возбудителей фузариоза по-прежнему достаточно ограничен: в частности, выявлено лишь небольшое число локусов, для которых разработаны специфические SCAR-маркеры (sequence characterized amplified region), дающие возможность с высокой достоверностью определять видовую принадлежность гриба.

В настоящей работе впервые проведён мультилокусный анализ обширной выборки штаммов грибов рода *Fusarium* всероссийской коллекции, паразитирующих на злаковых культурах. Работа позволила уточнить видовую принадлежность исследованных штаммов и охарактеризовать степень филогенетического родства между ними. В частности, впервые на территории России были идентифицированы штаммы вида *F. torulosum*, характеризующегося высокой изменчивостью, затрудняющей его идентификацию с помощью классических методов. В ходе исследования для некоторых видов впервые определены частичные последовательности ряда генов и обсуждена возможность их использования в качестве маркерных для идентификации и таксономической характеристики возбудителей фузариоза. Совокупность полученных результатов выявила однозначную корреляцию между степенью филогенетического родства видов грибов рода *Fusarium* и спектрами продуцируемых ими микотоксинов.

8.32. ПРОМЫШЛЕННЫЕ МНОГОСТЕННЫЕ УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ ВЫЗЫВАЮТ ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОРГАНАХ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МЫШИ

Сычевская К.А., Масютин А.Г., Ерохина М.В., Смирнова Е.А., Онищенко Г.Е.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва
Электронный адрес: KSesha1812@yandex.ru

Изучение потенциальной опасности многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) для организма млекопитающих является актуальной задачей, связанной с защитой здоровья человека, и поднимает вопрос относительно безопасности их производства и применения. Целью нашего исследования было изучить эффект регулярного продолжительного воздействия промышленного наноматериала на основе МУНТ "Таунит" на пищеварительную систему мышей. МУНТ в составе наноматериала добавляли в питьевую воду (30 мг/мл) экспериментальным животным в течение 30 дней. Методами световой и электронной микроскопии мы исследовали образцы тканей тонкого кишечника и печени с целью выявления интернализированных МУНТ и вызываемых ими патологических изменений. Наши результаты показали, что в тонкой кишке опытных животных наблюдаются множественные очаги некротических изменений с нарушением энтероцитарного слоя. Исследование ультраструктуры тонкого кишечника методом электронной микроскопии выявило разрушение микроворсинок энтероцитов, нарушение структуры крист и просветление матрикса митохондрий, вакуолизацию цитоплазмы, а также полный лизис отдельных клеток. В зонах некрозов наблюдалась инфильтрация плазмоцитами. При гистологическом анализе печени опытных животных выявляются дистрофические процессы (набухание гепатоцитов, появление светлых вакуолей и липидных капель в их цитоплазме, а также в цитоплазме клеток Купфера). Обнаруженные в ходе ультраструктурного исследования крупные, заполненные цитоплазматической жидкостью вакуоли, а также липидные капли в гепатоцитах и клетках Купфера, указывают на смешанную паренхиматозную дистрофию. В ходе ультраструктурного исследования гепатоцитов и клеток Купфера, а также энтероцитов тонкой кишки нами были выявлены наноразмерные частицы трубчатой формы (d~30-40 нм, l~100-500 нм). Наши результаты позволяют предположить, что, попадая в пищеварительный тракт, промышленные МУНТ вызывают множественные очаги некрозов, вероятно, путем механического воздействия на энтероциты. Неизвестно, проникают ли МУНТ в составе наноматериала через кишечник в кровь, оказывая прямое воздействие на печень и вызывая паренхиматозную дистрофию смешанного типа, или действуют опосредованно, через запуск воспалительных реакций.

8.33. ФОРМИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДНК - НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА

Толстыко Е.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
Электронный адрес: independence-et@yandex.ru

В настоящее время наблюдается большой интерес к разработкам, связанным с использованием наночастиц металлов в медицине. Это связано с их уникальными физико-химическими свойствами. Известно, что они проявляют антибактериальные свойства, обладают каталитической активностью, могут быть использованы для лечения злокачественных образований. Следует отметить также, что сопряжение наночастиц с биологическими объектами находит применение в таких далеких от медицины и биологии областях, как нанофотоника, наноэлектроника, информационные технологии. Основным подходом при этом является использование технологии ДНК оригами. Однако можно воспользоваться более дешевыми способами формирования соответствующих структур, используя конформационные свойства биополимеров. Молекула ДНК с этой точки зрения является уникальным объектом, позволяющим формировать структуры с новыми оптическими свойствами. Известно, что наночастицы металлов обладают так называемым плазмонным резонансом, который проявляется в изменении окраски соответствующих растворов. Комплексы ДНК с наночастицами позволяют формировать структуры в растворе и на подложке, которые могут быть интересны с точки зрения создания новых систем для решения различных задач нанофотоники.

В ходе проведенных исследований был отработан удобный и надёжный метод синтеза наночастиц серебра различной формы (сферические частицы, призмы и т.д.) с управляемым положением пика плазмонного резонанса во всём оптическом диапазоне (разной окраской растворов), так как частота плазмонного резонанса зависит от формы и размеров частиц, которые были изучены методами сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии. Также было изучено взаимодействие наночастиц с молекулой ДНК тимуса телёнка при разных условиях. Проводится анализ оптических свойств полученных структур. Особый интерес представляет также влияние наночастиц на конформацию молекулы ДНК.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 13-03-01192А) и СПбГУ (№ 11.38.644.2013).

8.34. СВЕТОИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОБЪЁМА САМООРГАНИЗУЮЩИХСЯ СТРУКТУР ДНК - ПАВ

Унксов И.Н.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
Электронный адрес: vanjaunksov@mail.ru

Известно, что перевод ДНК в компактную форму в растворе (конденсация ДНК) является ключевым условием для формирования генных векторов. Для конденсации ДНК необходима нейтрализация ее отрицательного заряда, поскольку именно высокая плотность этого заряда обеспечивает значительную жесткость макромолекулы в растворе и большой объем молекулярного клубка. Для компактизации *in vitro* могут быть применены комплексообразующие соединения различной природы: полимеры, поверхностно-активные вещества (ПАВ), мультивалентные ионы, липиды. При использовании светочувствительных катионных ПАВ компактизация/декомпактизация ДНК индуцируется с помощью облучения светом в УФ и видимом диапазоне. При этом происходит изомеризация соединения, находящегося в комплексе с ДНК. Молекулы ПАВ переходят в более гидрофобную или менее гидрофобную форму, что влечет за собой изменение размеров молекулярного клубка ДНК. Это свойство системы ДНК-ПАВ может быть использовано не только при создании генных векторов, но и при конструировании различных структур в растворе и на подложке в нанотехнологических разработках.

В работе проводили изучение конформационных изменений высокомолекулярной ДНК, происходящих в комплексах с цис- и транс-изомерами катионного ПАВ триметиламмоний бромида Азо(C₄)ТАБ, изомеризация азобензольной группы которого происходит под действием УФ-света. Для характеристики комплексов использовали методы спектрофотометрии, вискозиметрии, кругового дихроизма, динамического двойного лучепреломления, атомной силовой микроскопии. Приготовленные системы различались отношением концентраций заряженных групп $z=C(\text{ПАВ})/C(\text{ДНК})$. Изучали комплексы ДНК с ПАВ в растворах малой и большой ионной силы. Построены фазовые диаграммы. Наблюдали частичную обратимость "поджигания" молекулярного клубка, индуцированную облучением. При $z>1$ в растворах появлялся визуально наблюдаемый осадок, а при $z>2$ растворы вновь приобретают прозрачность, что соответствует показанному ранее методом атомной силовой микроскопии формированию в растворе компактных частиц в этой области.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 13-03-01192А) и СПбГУ (№ 11.38.644.2013).

СЕКЦИЯ 9 БИМЕДИЦИНСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ Na^+/K^+ -АТФазы ПОЧКИ КРЫСЫ В НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ПРОЛАКТИНА В МОДЕЛИ ХОЛЕСТАЗА БЕРЕМЕННЫХ

Абрамичева П.А., Балакина Т.А., Смирнова О.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, лаборатория эндокринологии, Москва
Электронный адрес: abramicheva.polina@gmail.com

Существуют различные патологии печени, характеризующиеся нарушением оттока или секреции желчи, связанные с беременностью, одна из которых - внутрипеченочный холестаз беременных. Известно, что уровень пролактина в плазме крови значительно возрастает в течение беременности. В нашей лаборатории было показано, что холестаз беременных сопровождается дополнительным ростом концентрации пролактина и нарушениями водно-солевого обмена. Есть данные о том, что пролактин оказывает натрийуретический и диуретический эффекты. Опираясь на результаты ранних исследований нашей лаборатории, мы выбрали Na^+/K^+ -АТФазу в качестве кандидата на конечную мишень действия пролактина в модели холестаза беременных. Работу проводили на беспородных половозрелых самках крыс, объединенных в следующие экспериментальные группы: интактные, без холестаза с гиперпролактинемией, с холестазом без гиперпролактинемии, с холестазом на фоне гиперпролактинемии (модель холестаза беременных). У животных измеряли суточный диурез, суточное потребление воды, натрийурез и концентрацию натрия в сыворотке крови, активность Na^+/K^+ -АТФазы во внешнем мозговом слое почки, а также сравнили относительное содержание Na^+/K^+ -АТФазы в разных экспериментальных группах животных с помощью вестерн-блоттинга (антитела к α_1 -субъединице Na^+/K^+ -АТФазы Na^+/K^+ -АТФазы α_1 (C464.6), Santa Cruz Biotechnology, Inc). Показано, что суточная экскреция натрия растет при гиперпролактинемии на фоне холестаза по сравнению с интактными и холестазными крысами и при холестазе по сравнению с интактными крысами. Этот рост натрийуреза сопровождается снижением активности Na^+/K^+ -АТФазы при гиперпролактинемии на фоне холестаза по сравнению с интактными самками. Концентрация натрия в сыворотке при гиперпролактинемии снижается по сравнению с интактными самками. Вестерн-блоттинг показал, что экспрессия α_1 -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы снижена у животных с холестазом на фоне гиперпролактинемии по сравнению с интактными самками.

9.2. ПОЛУЧЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО И ЭНДОГЕННОГО С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА СОБАКИ (сCRP)

Богомолова А.П.

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

С-Реактивный белок (CRP) относится к семейству пентраксинов и представляет собой гомопентамер с молекулярной массой мономера ~ 23 кДа. У человека и других млекопитающих CRP является белком острой фазы воспаления. Он обладает противовоспалительными функциями и защищает организм от чужеродных организмов до начала развития адаптивного иммунитета.

Собака является модельным объектом для исследования острой фазы воспаления у человека, а также для клинических исследований. Однако CRP собаки - сCRP - отличается от человеческого белка по первичной последовательности, также для него характерно наличие гликозилирования. Поэтому для того чтобы использовать собаку в качестве модели, необходимо охарактеризовать сCRP. Целью нашей работы было получение и сравнение рекомбинантного (rec) и эндогенного (end) сCRP.

Rec сCRP (как легко доступный аналог эндогенного белка) получали в культуре клеток насекомых с использованием бакуловирусной экспрессионной системы. Транслируемый белок содержал в своем составе отщепляемый сигнальный пептид, поэтому зрелый rec сCRP секретировался в культуральную среду. Детекцию сCRP в культуральной среде и определение его концентрации проводили в системах типа "сэндвич" с использованием моноклональных антител к сCRP, полученных в нашей лаборатории. Выделение rec сCRP из культуральной среды и end сCRP из сыворотки собак проводили методом аффинной хроматографии, где в качестве лигандов использовали производное фосфохолина (природный лиганд CRP) или моноклональные антитела к сCRP.

Было показано, что как end сCRP, так и rec сCRP состоят из двух типов субъединиц: гликозилированных и негликозилированных, причем молекулярные массы гликозилированных субъединиц в end и rec сCRP отличаются, что может быть связано с различиями в характере гликозилирования в клетках насекомых (бакуловирусная экспрессионная система) и клетках млекопитающих (собака). При этом моноклональные антитела, полученные к end сCRP, распознают rec сCRP так же, как и эндогенный. Также мы показали, что как end сCRP, так и rec сCRP предположительно гликозилированы по сайту NQS 147-149.

Методом гель-фильтрации было показано, что препараты end и rec сCRP представляют собой смесь пентамерной и мономерной форм сCRP. Также была исследована стабильность пентамерной формы сCRP в некоторых условиях и показана стабилизирующая роль кальция.

9.3. ДЕТЕКЦИЯ МУТАЦИЙ ЭКЗОНОВ 12-13 ГЕНА ASXL1 ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ ПРЯМОГО АВТОМАТИЧЕСКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г.

Министерство здравоохранения Свердловской области,
Уральский государственный медицинский университет Минздрава России
Электронный адрес: vinogradov-av@russia.ru

Цель исследования - определить частоту мутаций экзонов 12-13 гена ASXL1 при гемобластозах с использованием технологии прямого автоматического секвенирования.

Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 21 пациента с заболеваниями системы крови в возрасте от 18 до 68 лет, проходивших обследование и лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре с 2012 по 2014 гг. Среди них наблюдалось 16 больных острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ), 3 - острым лейкозом со смешанным фенотипом (ОЛСФ) с транслокацией t(9;22), 1 - бластной плазмацитоидной дендритоклеточной опухолью, 1 - хроническим миеломоноцитарным лейкозом. Морфологические варианты ОМЛ в соответствии с FAB-классификацией распределялись следующим образом: M0 - 2, M1 - 1, M2 - 5, M3 - 2, M4 - 3, M5 - 1, M6 - 1, M7 - 1.

Выделение тотальной РНК проводили методом сорбции на силикагелевом носителе с помощью комплекта реагентов "РИБО-сорб" (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Для проведения обратной транскрипции использовали набор "РЕВЕРТА-L-100" того же производителя. Участок гена ASXL1, включавший кодирующую последовательность экзонов 12 и 13, клонировали методом ПЦР с использованием пары праймеров ASXL-F (5' CCG GCT TGA AGA TCG TCA 3') и ASXL-R (5' GAC CCT CCT CAG CTG TCA AAT C 3'). Секвенирование ДНК проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) по прямой и обратной последовательностям с использованием праймеров ASXL-S1 (5' ACA CCG AAA AGC CAC AGC 3'), ASXL-S2 (5' ATG GTG GTG AGG CCT GTG 3') и ASXL-S3 (5' GAG GGG TGG GAG CAG CTT 3') согласно рекомендациям производителя. Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеотидов и аминокислот проводили с использованием компьютерной программы MEGA, версия 5.0.

Мутации гена ASXL1 выявлены в 5 случаях (23,8%). В четырех наблюдениях (ОЛСФ с транслокацией t(9;22), ОМЛ M0, ОМЛ M2 и ОМЛ M2базо) они были представлены делецией нуклеотидов в позициях с 1755 по 2007 кодирующей последовательности экзона 13 гена ASXL1, еще в одном (ОМЛ M4) - инсерцией гуанина в позиции 1935. Оба типа мутаций приводили к сдвигу рамки считывания и ранней термации трансляции кодируемого полипептида.

Таким образом, разработанная тест-система позволяет эффективно определять различные мутации экзонов 12-13 гена ASXL1 в пробах костного мозга и периферической крови при генотипировании гемобластозов.

9.4. КОРРЕКТИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ГЕПТАПЕПТИДА БЕТА-КАЗОМОРФИНА-7 (БКМ-7) НА ПАРАМЕТРЫ СОЦИАЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ У КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ ПРЕНАТАЛЬНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ВЫСОКОЙ ДОЗЫ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ

Гедзун В.Р., Малышев А.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва
Электронный адрес: vrgedzun@gmail.com

В нашей работе была использована модель расстройств аутистического спектра (РАС), основанная на пренатальном введении вальпроевой кислоты (ВПК) в дозе 600 мг/кг внутрибрюшино самкам белых крыс на 12,5 день беременности - так называемый фетальный вальпроатный синдром (ФВС).

Короткие пептиды - молодая, но перспективная группа веществ для создания фармацевтических препаратов. Эти соединения уже успешно используются в клинике для лечения множества заболеваний - панкреатита, сахарного диабета, дистрофии сетчатки, бронхиальной астмы. Экспериментальные и клинические данные указывают на то, что пептиды также обладают высокоспецифичным положительным влиянием на состояние и созревание ЦНС.

С целью попытки коррекции аутистических расстройств мы использовали опиоидный пептид материнского молока бета-казоморфин-7 (БКМ-7), внутрибрюшинное введение которого осуществлялось в 1-14 дни жизни в дозе 1 мг/кг.

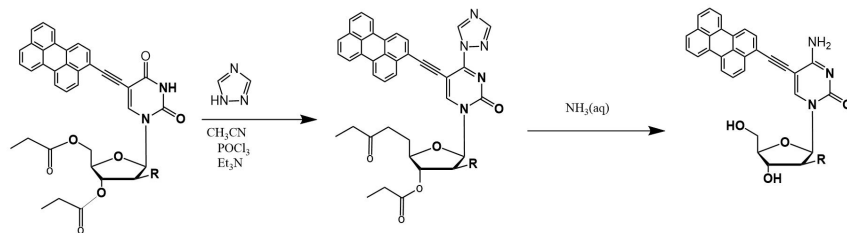
В ходе нашей работы был показан слабый анксиолитический эффект бета-казоморфина-7 без снижения двигательной активности, подтвержденный в тестах "Открытое поле" и "Приподнятый крестообразный лабиринт". В тестах, оценивающих зоосоциальные взаимодействия крыс, получавших БКМ-7, удалось выявить тенденцию к усилению мотивации к новым социальным контактам. В тесте "принудительное плавание" было выявлено антидепрессантное действие БКМ-7. Причем пептид оказывает влияние как на здоровых животных, так и на животных с ФВС. В тесте "Горячая пластина" был показан анальгезический эффект пептида БКМ-7. Кроме того, в тесте выработки условного рефлекса с отрицательным подкреплением было показано, что детеныши с ФВС, получавшие внутрибрюшинное введение пептида, обучались лучше, чем детеныши с ФВС, получавшие инъекцию растворителя.

9.5. СИНТЕЗ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЦИТИДИНА С ОБЪЕМНЫМИ АРОМАТИЧЕСКИМИ ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ

Гузь А.В., Стрешнев Ф.П., Чистов А.А., Устинов А.В., Коришун В.А.

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

В настоящее время ввиду широкой распространенности вирусных заболеваний, крайне важным является поиск новых противовирусных соединений с широким спектром действия. Ранее нам удалось получить нуклеозиды с объемными ароматическими заместителями, один из которых - 5-(3-периленилэтинил)-арабино-уридин проявлял высокую противовирусную активность по отношению ко многим оболочечным вирусам: вирусу герпеса 1-го и 2-го типов, вирусом ветряной оспы (*Varicella zoster*), Синдбис и гепатита С. Предполагается, что действие соединений подобного рода основано на ингибировании слияния суперкапсида вируса и мембраны клетки. Таким образом, данные вещества обладают ненуклеозидным механизмом действия, а именно не происходит образование из этих соединений трифосфатов. На основе этих данных было принято решение о синтезе аналогов с подобной структурой на основе цитидина, которые могут обладать схожими свойствами. Целью работы стало получение соединений этого класса и дальнейший анализ противовирусной активности. Имея богатый опыт работы с производными дезокси- и арабино-уридина, мы решили провести их трансформацию в соответствующие цитидины через промежуточные триазолиды вместо многостадийного синтеза из менее доступных аналогов. Ключевой особенностью является то, что в реакцию вступают уридины с различного рода заместителями, что позволяет получать цитидины с любыми заместителями, если имеются уридиновые аналоги. Стоит отметить, что использование вместо аммиака различных аминов делает возможным получение и N-замещенных цитидинов. В итоге, общее уменьшение числа стадий синтеза и переход к более дешевым реагентам позволяет быстро увеличить общее число доступных противовирусных аналогов для исследования на различных вирусах, что позволит более полно интерпретировать механизм действия и терапевтические эффекты.



9.6. ПОЛУЧЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ АПКОНВЕРТИРУЮЩИХ НАНОФОСФОРОВ

Джунушалиева А.Э.^{1,2}, Хайдуков Е.В.³, Нечаев А.В.², Зубов В.П.¹, Звягин А.В.⁴, Деев С.М.¹, Генералова А.Н.¹

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

² Московский университет тонких химических технологий, Москва

³ Институт лазерных и информационных технологий РАН, Москва

⁴ Macquarie University, Sydney NSW, Australia

Электронный адрес: ladygothdiva@gmail.com

Частицы редкоземельных металлов, допированные соединениями, проявляющими эффект апконверсии, являются многообещающей альтернативой традиционным флуоресцентным меткам. Примером таких соединений являются апконвертирующие нанофосфоры (НАФ), которые состоят из матрицы NaYF_4 и активаторов, например, Er^{3+} , Yb^{3+} , Tm^{3+} , которые могут флуоресцировать в видимой области при возбуждении ближним ИК-излучением. Эти частицы характеризуются узким пиком эмиссии, большим стоксовым сдвигом, химической и физической стабильностью, а также низкой токсичностью.

Синтез НАФ проводится в среде органических растворителей, в результате которого формируются гидрофобные наночастицы. Для биологического применения НАФ их необходимо модифицировать с целью получения стабильных водных дисперсий, содержащих реакционноспособные функциональные группы, которые могут быть использованы для конъюгации с биомолекулами в зависимости от их дальнейшего применения.

В данной работе были разработаны способы получения функционализированных биосовместимых реагентов НАФ путем их модификации амфифильными полимерами без удаления стабилизатора: сополимером малеинового ангидрида и октадецена (ПМАО) и полиэтиленимином (ПЭИ). Получены агрегативно устойчивые в буферных растворах в условиях физиологического pH отрицательно (ПМАО) и положительно (ПЭИ) заряженные водные дисперсии НАФ. Отработана методика иммобилизации модельного белка (бычьего сывороточного альбумина), определены оптимальные условия для данного процесса.

Разработаны способы получения гибридных частиц на основе НАФ и рибофлавина (B_2), который обладает фотосенсибилизирующим эффектом, и исследованы их фотофизические свойства.

9.7. СОЗДАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТОВ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ГИДРОЛАЗ НА ПОЛИСАХАРИДНЫХ НОСИТЕЛЯХ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЕЙ

Досадина Э.Э.¹, Белов А.А.²

¹ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, кафедра биотехнологии

² НИИ текстильных материалов, г. Москва
Электронный адрес: abelov2004@yandex.ru

Широкое развитие исследований по приданию необходимых функциональных свойств (биологической активности) именно целлюлозным волокнистым материалам обусловлено тем, что целлюлоза является доступным и распространенным в природе, широко применяемым в медицине полимерным материалом. Совместное использование волокнистых материалов и биосовместимых гелей (например, на основе хитозана (Хт)) позволяет получить сложные композиционные материалы, содержащиеся на одном носителе, но изолированные друг от друга, различные классы лекарственных веществ.

Системы с постепенным или контролируемым выделением активного вещества составляют важнейшую группу биологически активных полимерных систем. Постепенное попадание биологически активного вещества (БАВ) в организм в малых дозах, скорость которого можно регулировать, изменяя строение системы, позволяет устранить многие недостатки свободных БАВ, а также дает возможность ввести в организм повышенную дозу препарата. Наличие в организме сред от сильно кислых до щелочных создает возможность протекания разнообразных гидролитических процессов в биоматериалах, что обуславливает их разрушение. Способность полимера к биодеструкции определяется его химическим строением, в том числе микроструктурой, а также специфичностью тех ферментов, с которыми он контактирует. Диальдегидполисахариды, в том числе ДАЦ, способны к деструкции по окисленным звеньям в результате неферментативного (химического) гидролиза.

В ходе работы была исследована кинетика взаимодействия растворов хитозана с различными волокнистыми целлюлозными материалами: целлюлоза (Ц), диальдегидцеллюлоза (ДАЦ) и фосфорный эфир целлюлозы (ФЭЦ), в присутствии и отсутствии растворов глицерина. Показано, что взаимодействие Хт с целлюлозным носителем происходит в течение первого часа и практически не зависит от количества активных групп на носителе, а по всей видимости определяется только сорбционными свойствами Ц матрицы. Использование глицерина до 5 масс. % не влияет на взаимодействие хитозана с носителями.

Изучено взаимодействие полисахаридных носителей с комплексом гидролаз. Было установлено, что на процесс иммобилизации БАВ влияет не только степень модификации носителя, время, pH, состав среды для иммобилизации, но и дополнительно вводимые вещества (глицерин).

9.8. КОМПОЗИТНЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНОГО КОМПЛЕКСА ХИТОЗАНА С ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ И ГИДРОКСИАПАТИТА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ

Дрезваль О.А.^{1,2}, Дроздова М.Г.², Успенский С.А.³, Демина Т.С.³, Аكوпова Т.А.³, Зеленецкий А.Н.³, Марквичева Е.А.²

¹ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

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

³ Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва

Электронный адрес: dertic.morgan@gmail.com

Увеличением средней продолжительности жизни человека во всем мире приводит к повышенному риску переломов, основной причиной которых является последовательное вытеснение остеобластогенеза в костном мозге адипогенезом, что делает естественную регенерацию повреждений всё менее эффективной. Поэтому восстановление костной ткани методами тканевой инженерии становится всё более актуальным. Одним из подходов тканевой инженерии является применение композитных полимерных матриц, содержащих гидроксиапатит (ГА) в качестве биологически активной добавки, стимулирующей остеогенную дифференцировку стромальных клеток, а также улучшающей механические свойства матрикса.

Целью данной работы было исследование гидрогелей на основе полиэлектrolитного комплекса хитозана с гиалуроновой кислотой, содержащих гидроксиапатит, в качестве матриц для восстановления костной ткани.

Методом криоконструирования были получены композитные гидрогели, содержащие включенный в них ГА в различных концентрациях (1, 5 и 10% масс.). Структура полученных гидрогелей была исследована методами конфокальной и сканирующей электронной микроскопии. Были также изучены стабильность полиэлектrolитного комплекса и набухаемость гидрогелей в различных средах. Цитотоксичность полученных гидрогелей была исследована методом тестирования экстрактов. Рост и пролиферацию мышечных фибробластов (L929), остеобластных клеток человека (HOS) и мезенхимальных стромальных клеток (MSC), выделенных из жировой ткани человека, оценивали с помощью МТТ-теста после 7 дней культивирования.

Было показано, что структура, набухаемость и скорость деградации в различных средах существенно зависели от содержания ГА. Была обнаружена незначительная цитотоксичность гидрогелей, при этом было продемонстрировано, что они способны поддерживать рост и пролиферацию всех трех типов животных клеток.

9.9. НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКСА ДОКСОРУБИЦИНА С ДНК КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ

Духанина Е.В., Лысенко Ю.А.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Электронный адрес: renata_elena@rambler.ru

Доксорубин (ДР) представляет собой антибиотик антрациклинового ряда, используемый в противоопухолевой терапии в отношении новообразований различной этиологии. Считается, что основное противоопухолевое действие этого вещества связано с образованием комплекса ДНК - ДР посредством интеркалирования молекул последнего между парами азотистых оснований. Однако исследования подобного рода взаимодействий проводились, в основном, на модельных системах с использованием препаратов ДНК неопухолевых клеток. В связи с этим представлялось актуальным проведение экспериментов, направленных на выявление особенностей взаимодействия доксорубина с ДНК, выделенной нами из клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), в условиях различного микроокружения (варьирование ионной силы раствора, нагревание, УФ-облучение). Визуализацию молекул ДНК в свободной форме и в комплексе с ДР осуществляли методом атомно-силовой микроскопии. Изменения гидродинамического радиуса изучаемых объектов проводили с использованием установки для измерения динамического светорассеяния. Также были исследованы модификации спектральных и электрофоретических (1,5 % гель агарозы) характеристик полученных образцов. Объекты облучали УФ-светом (240-390 нм) в диапазоне доз 1510-9060 Дж/м².

Нами выявлено, что после добавления ДНК к раствору ДР в полосе его поглощения (478 нм) наблюдается гипохромный эффект (41,2%), сопровождающийся bathochromным сдвигом максимума экстинкции на 14 нм. После нагревания и последующего охлаждения растворов антибиотика в комплексе с ДНК наблюдали повышение интенсивности в максимуме абсорбции ДР на 8,8% относительно контрольной величины, а также дополнительный bathochromный сдвиг на 3 нм. Показано, что ДР препятствует термоденатурации ДНК при нагревании (95оС) их смеси. Установлено увеличение оптической плотности в минимуме поглощения ДНК (230 нм) и повышение электрофоретической подвижности ее фракций, коррелирующие с ростом дозы УФ-облучения. При этом фотомодификация в дозе 9060 Дж/м² индуцировала уширение электрофоретической фракции ДНК, свидетельствующее об увеличении ее гетерогенности. Также обнаружена различная электрофоретическая подвижность интактной и УФ-облученной ДНК в комплексе с ДР. Таким образом, нами продемонстрировано, что связывание ДР с ДНК АКЭ способствует модификации физико-химических характеристик обоих соединений и может изменять чувствительность ДНК к действию внешних агентов.

9.10. МИКРОНОСИТЕЛИ НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Злобина М.А.^{1,2}, Дроздова М.Г.², Фомин А.С.³, Фадеева И.В.³, Демина Т.С.⁴, Аكوпова Т.А.⁴, Зеленецкий А.Н.⁴, Марквичева Е.А.²

¹ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

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

³ Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва

⁴ Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва

Электронный адрес: marishkalava@mail.ru

Микроносители на основе гидроксипатита (ГА) активно изучаются в качестве матриц для восстановления костной ткани в тканевой инженерии. Показано, что этот минерал, введенный в состав микроносителей, гидрогелей или волокон, способен стимулировать направленную дифференцировку стволовых клеток в остеобласты [1,2]. Химическая модификация ГА с целью оптимизации роста и дифференцировки клеток является актуальной задачей тканевой инженерии.

Цель работы - получение и изучение микроносителей на основе различных фосфатов кальция для культивирования животных клеток. Мы изучали рост клеток на микроносителях на основе фосфатов кальция следующего состава: трёхкальциевый фосфат (ТКФ), кремний содержащий ГА (0,1SiГА, степень замещения групп PO₄ на SiO₄ в структуре ГА 10 мол. %), карбонат-замещённый ГА (КГА, степень замещения групп PO₄ на CO₃ 6 мол. %) и композиционный материал ГА/ТКФ с массовым соотношением фаз 80/20. Использовали клетки мышечных фибробластов (L929), остеобластные клетки человека (HOS), а также мезенхимальные стромальные клетки (MSC), выделенных из жировой ткани человека. Рост клеток контролировали с помощью оптической и конфокальной микроскопии, а количество жизнеспособных клеток определяли с помощью МТТ-теста после 4 и 7 дней культивирования. Было показано, что микроносители поддерживают рост и пролиферацию клеток. Кроме того, было изучено влияние химического состава микроносителей на способность стимулировать направленную дифференцировку MSC в остеобласты методом определения активности щелочной фосфатазы - раннего маркера остеогенной дифференцировки.

Литература

1. Prosecká E. et al. Thin-layer hydroxyapatite deposition on a nanofiber surface stimulates mesenchymal stem cell proliferation and their differentiation into osteoblasts // J. Biomed. Biotechnol., 2012; doi: 10.1155/2012/428503.
2. Feng J. et al. A scalable approach to obtain mesenchymal stem cells with osteogenic potency on apatite microcarriers. J. Biomater., 2013, 29(1):93-103.

9.11. ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO* ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛЕНТИВИРУСОВ, НЕСУЩИХ siRNA К ГЕНАМ HIF-1a, HSA8, APEX1, CCND3 В 2D И 3D МОДЕЛЯХ

Зубков Д.А., Смирнова Е.В., Бойко А.А., Свищевская Е.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Электронный адрес: tanker84@mail.ru

РНК интерференция является одним из методов терапии рака. Несмотря на успешные данные экспериментов по РНК интерференции различных генов, в клинике эффективность доказана только для ограниченного числа последовательностей. Поскольку при раке наблюдается гиперэкспрессия многих генов, то мультиплексная РНК интерференция может быть более эффективной, чем подавление экспрессии только одного гена. Целью нашей работы было клонирование и анализ эффективной мультиплексной интерференции генов HIF-1a, HSA8, APEX1, CCND3, гиперэкспрессированных при раке поджелудочной железы (РПЖ). В работе использовали клетки РПЖ человека ТЗМ4 и VxPC-3, культивируемые в обычных условиях (2D) и на антиадгезивной пленке PolyHEMA (3D). Отобранные последовательности для РНК интерференции клонированы в вектор pGreenPuro (SBI). Вирусы наработаны в клетках HEK293T и очищены на мембранах с отсечкой 100 кДа. Эффективность подавления целевых генов проверяли с помощью ПЦР в реальном времени и вестерн-блот анализа. Способность к подавлению пролиферативной активности проверяли с помощью МТТ-теста. Результаты анализа экспрессии генов и белков значительно различались, в частности, для генов CCND3 и HSPA8. Верификацию данных проводили с помощью проточной цитометрии. Полученные вирусы и их комбинации использовали для анализа влияния на пролиферацию клеток в 2D и 3D культурах. Во всех случаях ряд комбинаций оказывал достоверно больший эффект на пролиферацию клеток. Эффект не является специфичным для панкреатических клеток. Вирусы подавляли также и пролиферацию кератиноцитов HaCaT. Аналогичные результаты были получены в 3D культурах. На панкреатических клетках в 3D культурах выявили большую эффективность вирусов, несущих shRNA к гену CCND3, по сравнению с shRNA к гену APEX1, где в низких разведениях вирусов наблюдали стимуляцию пролиферации. Использование комбинированной терапии может быть более эффективным, чем подавление экспрессии одного гена, однако комбинации надо подбирать для индивидуального типа рака.

9.12. ДВУСТОРОННЯЯ ЭЛЕКТРОКОАГУЛЯЦИЯ СРАМНОГО НЕРВА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИСПЫТАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ОТ СТРЕССОВОГО НЕДЕРЖАНИЯ МОЧИ

Исмаилова А.М.¹, Туховская Е.А.¹, Мурашев А.Н.¹, Фатхудинов Т.Х.²

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино
²Институт акушерства и гинекологии, Москва
Электронный адрес: ismailowa.a.m@yandex.ru

Для испытания препаратов, способствующих лечению стрессового недержания мочи, необходимо подобрать методику, адекватную, достаточно точную и менее затратную в плане использования ресурсов и лабораторных животных. Это являлось целью нашего исследования.

Иссечение срамного нерва (nervus pudendus) у крыс - возможный метод для решения поставленной задачи. Повреждение n.pudendus иннервирующей мышцы уретры приводит к нарушению их работы и постепенному атрофированию, что и послужит причиной возникновения недержания. Для определения эффективности манипуляции и влияния тестируемого препарата проводилось измерение точки подтекания LPP (Leak Point Pressure).

Повреждение n.pudendus - хирургическая процедура для выделения и последующего иссечения срамного нерва. Для этого необходимо выбрать наименее травматичный способ с максимальной вероятностью достижения цели процедуры. Мы испытали несколько способов:

1. Передний - один разрез внизу с вентральной стороны со вскрытием брюшной полости в области уретры. 2. Боковой - два разреза с вентральной стороны, по бокам от уретры, со вскрытием брюшной полости. 3. Задний - два разреза с дорсальной стороны в областях вертлужной впадины, электрокоагуляция в месте сочленения сустава.

Исходя из полученных результатов, наиболее эффективным оказался метод 3, при котором наблюдается практически 100% выживание, а также достижение цели операции у 90% животных, то есть снижение значений LPP на 37%. При втором методе наблюдается частичная смертность среди животных (10%), снижение LPP наблюдалось лишь у части крыс (40% от количества выживших). Способ с передним доступом привел к 100% смертности экспериментальных животных.

На основе полученных результатов можно сделать вывод об эффективности двусторонней электрокоагуляции срамного нерва как метода для испытания препаратов от стрессового недержания мочи.

9.13. УЛУЧШЕННАЯ ВАКЦИНА ОТ ГЕМОФИЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

Кривых П.О., Власов П.К.

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

Гемофильная инфекция представляет серьезную опасность для всего мира из-за многочисленных возникающих осложнений. Ежегодно она уносит жизни 17% детей младше пяти лет по всему миру (около 400 000 человек).

Борьба с гемофильной инфекцией осложнена несколькими обстоятельствами:

- PS капсула гемофильной палочки (вызывает реакцию на уровне рецепторного комплекса CD14/TLR4/MD2) препятствует бактериолизу, что затрудняет спецификацию Т и В-лимфоцитов;

- гемофильная палочка выделяет экзотоксин протеазу, разрушающую SIgA;

- дети младше пяти лет не способны сформировать адекватный иммунный ответ без участия Т-лимфоцитов.

Проблему высокой смертности от гемофильной инфекции можно решить лишь массовой вакцинацией. Все существующие вакцины действуют по принципу стимуляции иммунного ответа за счет естественных (патогенных) компонентов, которые чрезвычайно дороги. Поэтому вакцины недоступны развивающимся странам, которые больше всего в них нуждаются.

Мы предлагаем проект вакцины, которая будет действовать по принципу стимуляции клеточного иммунного ответа (как и уже используемые вакцины), усиливая его за счет дополнительных компонентов (иммуногенные пептиды и низкомолекулярные вещества) в комплексе с липополисахаридом оболочки гемофильной палочки. Дополнительные компоненты предлагается подбирать, исходя из их целевого действия на нужный каскад иммунных реакций.

Состав вакцины:

1. Химерный конъюгат из обычных антигенных детерминант бактерии (участка LP капсулы) и дополнительных антигенных детерминант.

2. Обычные и дополнительные антигенные детерминанты, прикрепленные на специальный носитель - липосому.

Проект находится на стадии утверждения веществ, показавших хорошие перспективы модуляции иммунного ответа в теоретических расчетах для проверки на клеточных линиях.

9.14. ЭФФЕКТЫ ОДНОКРАТНОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ОБЕСТАТИНА И ЕГО ФРАГМЕНТА 1-4 НА ВЕГЕТАТИВНЫЙ БАЛАНС У САМЦОВ КРЫС

Курко О.Д., Хиразова Е.Э., Моторыкина Е.С., Маслова М.В., Маклакова А.С., Граф А.В., Замятина Л.А., Андреева Л.А., Соколова Н.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва
Институт молекулярной генетики РАН, Москва
Электронный адрес: flute2601@gmail.com

В последнее время осуществляется активный поиск эндогенных регуляторов аппетита, направленных на снижения массы тела. Особое внимание уделяется недавно открытому анорексигенному пептиду обестатину и его фрагментам, обладающим схожим действием. Однако среди эффектов анорексигенных пептидов мало внимания уделяется их влиянием на другие системы организма. В связи с этим целью данной работы стало исследование влияния обестатина и его фрагмента 1-4 на вегетативный баланс у крыс.

Работа проводилась на самцах крыс линии Wistar весом 250-300 г. Обестатин (FNAPFDVGIKLSGAQYQQHGRAL-NH₂) или его фрагмент 1-4 (FNAP-NH₂) вводили интраназально в дозе 300 нмоль/кг однократно или хронически (в течение 5 суток). Контрольные животные интраназально получали соответствующий объем физиологического раствора. На следующие сутки и через неделю после прекращения введения веществ регистрировали отставленное влияние исследуемых веществ на вегетативный баланс. Оценка вегетативного баланса осуществлялась на основе записи электрокардиограммы животного, находящегося в условиях свободного поведения. С помощью регистрируемых параметров рассчитывался стресс индекс (SI), отражающий вклад симпатического компонента и индекс тонуса парасимпатической регуляции (RMSSD), для оценки парасимпатического вклада в вегетативный баланс регуляции. Кроме того, раз в сутки до 10 дня наблюдений в условиях *ad libitum* регистрировали потребление воды и корма, а также массу каждого животного. Однократное интраназальное введение обестатина и его фрагмента 1-4 приводило к значимому снижению массы тела, потребления воды и корма, начиная со вторых суток после введения веществ. Однако изменение вегетативного баланса в сторону повышения SI и снижения RMSSD наблюдалось только на следующие сутки после введения обестатина. Хроническое введение фрагмента обестатина 1-4, в отличие от целого пептида, приводило к значимому снижению массы тела, потребления воды и корма. При этом реакция на вегетативный баланс после хронического введения исследуемых веществ выявлено не было.

9.15. ПОДАВЛЕНИЕ 4-ГЕКСИЛРЕЗОРЦИНОМ ЭФФЕКТА СТИМУЛЯЦИИ ФОРМИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК НИЗКИМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ АЗИТРОМИЦИНА

Мартьянов С.В., Журина М.В., Плакунов В.К.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

Электронный адрес: aegorodum102011@gmail.com

Интерес к микробным биопленкам связан, в первую очередь, с повышенной устойчивостью микроорганизмов, входящих в их состав, к различного рода антимикробным агентам. В связи с этим большая часть работ по изучению биопленок проводится с использованием патогенных или условно патогенных штаммов и относится к разряду медицинской микробиологии. Недавно обнаружено явление стимуляции образования биопленок у патогенных микроорганизмов в присутствии низких концентраций антибиотиков. Нами доказано наличие этого феномена и у сапротрофных бактерий, что свидетельствует о его общебиологическом характере. Одним из перспективных направлений борьбы с биопленками является сочетание антибиотика с другим фактором, ингибирующим рост биопленок (фаги, ультразвук, аналоги молекул quorum sensing). В качестве дополнительного ингибирующего агента мы использовали 4-гексилрезорцин - представитель ауторегуляторных алкилоксибензолов АОБ. Это вещество уже применяется как пищевая добавка, не токсично для человека, что важно в случае его использования в медицине. Сам по себе АОБ обладает невысокой ингибиторной активностью в отношении микробных биопленок, но, как показано нами, обнаруживает синергидное действие при комбинировании его с антибиотиками, в частности, с азитромицином. И что самое главное, АОБ полностью предотвращает стимулирующее действие на формирование биопленок как у грамположительных (*Dietzia natronolimnae*, *Kocuria rhizophila*, *Rhodococcus equi*), так и у грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas chlororaphis*, *Chromobacterium violaceum*) низких концентраций антибиотика, которые могут создаваться в макроорганизме при несоблюдении режима химиотерапии. Результаты окрашивания биопленок специфичным для кислых полисахаридов красителем (1,9-диметилметиленовым синим) указывают на то, что механизм действия АОБ может быть связан с подавлением синтеза матричных полисахаридов. Таким образом, АОБ в сочетании с азитромицином представляется перспективным соединением для борьбы с формированием микробных биопленок.

9.16. ДОЗОЗАВИСИМОСТЬ ЭФФЕКТОВ ФРАГМЕНТА ОБЕСТАТИНА 1-4 У САМОК КРЫС

Моторыкина Е.С., Хиразова Е.Э., Маслова М.В., Граф А.В.,
Маклакова А.С., Курко О.Д., Замятина Л.А., Андреева Л.А.,
Соколова Н.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф.

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

Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Электронный адрес: motorykina.katerina@gmail.com

В современном мире особое внимание уделяется эндогенным регуляторам аппетита, а именно, недавно открытому анорексигенному пептиду обестатину и его фрагментам. Однако, как правило, эти исследования проводятся на самцах и не учитываются гендерные различия возможных эффектов. В связи с этим, целью данной работы стало исследование влияния фрагмента обестатина 1-4 на самок крыс, а также анализ дозозависимости эффектов.

Работа проводилась на самках крыс линии Wistar весом 250-300 г. Фрагмент обестатина 1-4 (FNAP-NH₂) вводили однократно интраназально в дозе 100, 300, 1000 нмоль/кг. Контрольные животные интраназально получали соответствующий объем физиологического раствора. В течение 10 дней, в условиях ad libitum регистрировали потребление воды и корма, а также массу каждого животного. Кроме того, на следующие сутки и через неделю после прекращения введения веществ регистрировали влияние исследуемых веществ на поведенческую активность в различных поведенческих тестах, вегетативный баланс и оценивали уровень порога болевой чувствительности. В результате нами было зафиксировано значимое снижение массы тела самок крыс, начиная с восьмого дня измерений и до окончания наблюдений после введения фрагмента обестатина в дозе 100 нмоль/кг, и снижение массы на 10 сутки после введения фрагмента в дозе 300 нмоль/кг. Одновременно со снижением массы тела у самок крыс наблюдалось снижение потребления воды после введения двух исследуемых доз, изменения потребления корма обнаружено не было. После введения фрагмента в дозе 1000 нмоль/кг изменений вышеперечисленных параметров выявлено не было. Введение фрагмента в дозе 100 нмоль/кг приводило к увеличению локомоторной активности через неделю после введения пептида, аналогичным образом было зарегистрировано увеличение уровня тревожности после введения пептида в дозе 1000 нмоль/кг. Фрагмент 1-4 в исследуемых дозах не оказал значимого влияния на показатели вегетативного баланса и болевой чувствительности. Таким образом, в наибольшей степени на массу тела самок крыс после однократного введения оказал влияние фрагмент обестатина в дозе 100 нмоль/кг, что сопровождалось уменьшением потребления воды. Введение фрагмента в данной дозе не оказывало влияния на вегетативный баланс и уровень тревожности, при этом увеличивался уровень локомоторной активности.

9.17. БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ ОТРАВЛЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМ СОЕДИНЕНИЕМ НА МЫШАХ

Паликов В.А.², Паликова Ю.А.², Смирнов И.В.³, Дьяченко И.А.¹,
Мурашев А.Н.¹

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

² Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград.

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

Электронный адрес: viktorpalikov@mail.ru

Актуальность и практическая значимость проблемы отравления фосфорорганическими соединениями обусловлена тем, что они обладают антиэстеразной активностью и широко применяются в сельском хозяйстве и промышленности. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, 200 000 человек ежегодно умирают в развивающихся странах в результате отравления фосфорорганическими соединениями (ФОС).

ФОС являются необратимыми ингибиторами холинэстераз - ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и бутирилхолинэстеразы. АХЭ играет главную роль в холинергической системе, завершая действие ацетилхолина. Таким образом, синаптические АХЭ являются первичными мишенями ФОС. Основной причиной острой токсичности ФОС является необратимое ингибирование АХЭ.

В отличие от плазмы мышей плазма крови человека не содержит карбоксилэстеразы, которая является важным эндогенным ферментом, участвующим в детоксикации ФОС.

В нашей биомодели в качестве ФОС был использован параоксон. Чтобы максимально снизить фоновую активность эндогенной карбоксилэстеразы у мышей линии BALB/c, был использован ингибитор крезилбензодиоксафосфоринноксид (СВDP), который полностью подавлял действие данного фермента. СВDP в дозе 1,5 мг/кг вводился подкожно двум группам мышей, после чего через 30 минут этим же группам внутривенным способом вводили параоксон в двух дозах: 0,5 мг/кг и 0,6 мг/кг. Также в качестве контроля были использованы группы мышей, которым не вводился СВDP, и параоксон использовался в трех дозах: 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг и 0,7 мг/кг.

Результаты. Группы мышей, которым не вводили СВDP: в дозе параоксона 0,5 мг/кг проявляли двигательную активность спустя 5 часов после введения ФОС, в дозе 0,6 мг/кг спустя 7 часов, а в дозе 0,7 мг/кг наблюдалась гибель всей группы в течение 10-12 минут. Мыши, которым вводили СВDP: в дозе параоксона 0,5 мг/кг, проявляли двигательную активность спустя 6 часов, в дозе 0,6 мг/кг происходила гибель группы в интервале 7-10 минут с момента введения параоксона.

Таким образом, нами получена адекватная биомодель отравления ФОС, которая максимально приближает "эстеразный статус" мыши к человеческому.

9.18. ИЗУЧЕНИЕ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА РТ1

Паликова Ю.А.², Паликов В.А.², Андреев Я.А.³, Дьяченко И.А.¹,
Мурашев А.Н.¹

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

² Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

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

Электронный адрес: ulia2791@rambler.ru

Восприятие боли - важная способность организма, позволяющая избегать раздражителей и минимизировать наносимый ему вред. Используемые в настоящее время анальгетики характеризуются рядом недостатков, поэтому ведущие исследовательские коллективы и фармацевтические компании заняты разработкой новых болеутоляющих средств.

Источником новых мощных анальгетиков могут служить природные яды. Из Среднеазиатского паука-волка исследователи базовой кафедры МФТИ и ИБХ РАН выделили пурогосин (РТ1) - пептид, ингибирующий один из важнейших подтипов болевых рецепторов человека.

Целью работы является изучение анальгетической активности рекомбинантного полипептида РТ-1 на мышах CD-1.

Анальгезирующее действие РТ-1 мы проверяли с помощью теста гиперчувствительности, спровоцированной СFA. Группам животных в заднюю лапу субплантарно вводится смеси СFA (полного адьюванта Фрейда) с 0,9% NaCl(1:1).

Через 21-24 часа после введения СFA экспериментальным животным внутримышечно вводили РТ-1 в дозах 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 мг/кг в соответствии с групповой принадлежностью, контрольным животным - 0,9% NaCl.

Через 60 минут проводили испытание порога болевой чувствительности. Результаты. При внутримышечном способе введения по результатам теста гиперчувствительности, спровоцированной СFA через 60 минут в дозах 0,001 и 0,01 мг/кг, были отмечены достоверные отличия между экспериментальными и контрольными группами. При тестировании через 24 часа достоверные отличия были отмечены в дозах 0,001; 0,01 и 0,1 мг/кг.

Таким образом, проведено исследование анальгетической активности РТ-1 в тесте гиперчувствительности, спровоцированной СFA при внутримышечном введении РТ-1 в различных дозировках и тестированием в различные временные интервалы. Показана высокая фармакологическая активность РТ-1 в различных дозировках и различных временных точках.

9.19. ИССЛЕДОВАНИЕ КОНКУРЕНТНЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ КАНДИД И ЛАКТОБАКТЕРИЙ *IN VITRO*

Сачивкина Н.П., Куликов Е.В., Карамян А.С.

Российский университет дружбы народов, Москва

Электронный адрес: sachivkina@yandex.ru

Цель - выяснить, как при совместном культивировании штаммов *Lactobacillus casei* и клинических *Candida albicans* (С.а.) изменяется жизнеспособность последних.

Материалы и методы исследования. В исследовании была использована культура лактобацилл *Lactobacillus casei* и 3 клинических штамма дрожжеподобных грибов (ДПГ), полученных от женщин с вагинальным кандидозом. Каждую суточную культуру ДПГ 1,0 мл концентрации 10^8 КОЕ/мл по стандарту мутности соединяли с культурой лактобацилл 1,0 мл концентрации 10^8 КОЕ/мл и культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 10% CO_2 . В качестве контролей использовали не смешанные, а чистые культуры только ДПГ в средах Сабуро. Количество жизнеспособных кандид после совместной инкубации определяли на плотных питательных средах подсчетом выросших колоний в 0,01 мл суспензии из жидких питательных сред через 24, 48 и 72 часа. Посев осуществлялся газонем, а через сутки в термостате число полученных колоний мы умножали на 100 для перевода результатов на 1 мл объема. Оценка ингибирующего действия *Lactobacillus casei* на С.а. оценивалась по разнице числа колоний по сравнению с контролем.

Результаты. Безусловно, каждый клинический штамм даже при всех одинаковых условиях накапливает грибковую массу по-разному. В контроле через 72 часа инкубации число ДПГ в 1 мл жидкой среды Сабуро достигает у всех трех культур значения 10^9 КОЕ. Под воздействием лактобактерий концентрация С.а. №1 снижется через 24 ч с 10^8 КОЕ/мл до 10^6 КОЕ/мл, т.е. в 100 раз. Через 48 и 72 часа - в 10000 раз. Штамм №2 повел себя по-другому: на вторые сутки совместного культивирования концентрация грибов снизилась с 10^8 КОЕ/мл до 10^7 КОЕ/мл, т.е. в 10 раз и осталась такой же на третьи сутки. Штамм №3: концентрация С.а. на вторые сутки снизилась до 10^4 . На третьи сутки концентрация грибов составила 10^3 КОЕ/мл.

Выводы. В нашем исследовании мы выявили явные конкурентные взаимоотношения ДПГ рода *Candida* и *Lactobacillus casei in vitro*. Подавляя рост грибов *in vivo*, лактобациллы могут обеспечить колонизационную устойчивость и поддерживать низкий уровень концентрации дрожжевых клеток в организме, что особенно актуально на фоне развития повсеместного антимикотикоустойчивого кандидоза.

9.20. ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛЬГЕТИЧЕСКОГО ПОЛИПЕПТИДА PT1 ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ CD-1

Скобцова Л.А.^{1,2}, Андреев Я.А.³, Дьяченко И.А.^{1,2}, Мурашев А.Н.^{1,2}

¹ Филиал Института биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

² Пушкинский государственный естественно-научный институт (ПушГЕНИ), Пушкино

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: lyu2000@inbox.ru

За последние десятилетия наметился возрастающий интерес к поиску новых соединений, обладающих терапевтическим потенциалом в отношении пуринаргических рецепторов (P2-рецепторов). Одним из таких веществ является пуротоксин-1 (PT1), выделенный из яда паука *Geolycosa* sp. Данный пептид селективно ингибирует P2X3-рецепторы, которые участвуют в генерации сигнала боли. Анальгетические свойства пептида PT1 продемонстрированы при внутривенном способе введения в тесте тепловой гиперчувствительности, спровоцированной CFA (модель боли при воспалении, вызванном инфекцией) на мышцах линии CD-1. Отмечали латентное время с момента помещения животного на горячую пластину до первого облизывания лапы, в которую вводится CFA. В исследовании были использованы животные, полученные из НПП "Питомник лабораторных животных" ФИБХ РАН, весом 19-21 г, которые содержались при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$. В качестве положительного контроля выступала группа животных, которым вводили растворитель - физиологический раствор 0,89%. Экспериментальным группам внутривенно вводили PT1 в дозе 0,1 мг/кг с последующим тестированием на 15, 60 минутах, 4, 8 и 24 часов после введения. Контрольным и экспериментальным группам вводили тестируемые вещества в объеме 10 мл/кг. Животные использовались один раз вне зависимости от группы и способа введения с последующей эвтаназией. Достоверность различий между контрольной и экспериментальными группами определяли с помощью анализа вариабельности (ANOVA) и пост теста Тьюки.

При внутривенном введении пептида PT1 0,1 мг/кг в тесте гиперчувствительности, спровоцированной CFA, на 15, 60 минутах, 4, 8 и 24 часов получен достоверный результат анальгетической активности в сравнении с группой, получавшей физиологический раствор. Таким образом, полипептид PT1 в тесте тепловой гиперчувствительности, спровоцированной CFA, оказывает выраженное анальгетическое действие в дозе 0,1 мг/кг на протяжении 24 часов.

9.21. ВЛИЯНИЕ СЕРДЕЧНЫХ ГЛИКОЗИДОВ НА ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Слободкина Е.А., Куликов А.В., Животовский Б.Д.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, лаборатория изучения механизмов апоптоза, Москва

Электронный адрес: info@fbm.msu.ru

Действуя на клетку, сердечные гликозиды (СГ) типа убаина и дигоксина, ингибируют Na^+/K^+ -АТФазу и при этом влияют не только на ионный гомеостаз, но и активируют внутриклеточные сигнальные системы, затрагивающие изменения клеточного метаболизма, процессы роста, миграции клеток, а также клеточную гибель. СГ известны как кардиотонические средства, обладающие положительным инотропным эффектом и применяемые для лечения заболеваний сердца, например хронической сердечной недостаточности. Клинические наблюдения последнего времени показали, что среди пациентов, принимавших СГ для лечения сердечных заболеваний, риск развития рака был существенно ниже, чем у пациентов, не получавших данные препараты. Появилась перспектива использования сердечных гликозидов в качестве противоопухолевых препаратов. Большой интерес представляет использование СГ в комбинации со стандартными противоопухолевыми препаратами с целью усиления терапевтического эффекта и снижения их токсичности. В данной работе мы изучали влияние и механизмы воздействия сердечных гликозидов (на примере убаина и дигоксина) на противоопухолевую активность таких химиотерапевтических препаратов как цисплатин и этопозид. Работа проводилась на клетках колоректального рака HCT116. С помощью различных методов оценки гибели клеток, включая проточную цитометрию и оценку каспазной активности, обнаружено, что дигоксин усиливает цитотоксичность этопозиды, в то время как противоопухолевая активность цисплатина при использовании его совместно с дигоксином уменьшается. Эти данные были подтверждены оценками содержания цитохрома *c* в цитоплазматической и мембранной фракциях клеток и уровня расщепления белка PARP, которые проводили методом вестерн-блоттинга с использованием специфических антител. Известно, что выход цитохрома *c* в цитоплазму из митохондрий является событием, необратимо запускающим каскад апоптоза, в то же время PARP является субстратом для каспазы-3 и -7, и его расщепление является одним из характерных маркеров апоптоза. Мы показали, что при действии противоопухолевых препаратов (цисплатина и этопозиды), а так же дигоксина в комбинации с этими препаратами наблюдается увеличение выхода цитохрома *c* и увеличение уровня расщепленной формы PARP. Причем, в пробах, полученных из клеток, обработанных этопозидом совместно с дигоксином, наблюдается увеличение содержания цитохрома *c* в цитоплазматической фракции и повышение уровня расщепленной формы PARP по сравнению с клетками, обработанными только этопозидом. Для клеток, обработанных цисплатином в комбинации с СГ, напротив, наблюдается уменьшение содержания цитохрома *c* и расщепленной формы PARP по сравнению с клетками, обработанными только цисплатином. Таким образом, полученные данные говорят о влиянии сердечных гликозидов на цитотоксическую активность противоопухолевых препаратов, причем в зависимости от используемого препарата, совместное действие с СГ может приводить как к ослаблению, так и к усилению гибели опухолевых клеток.

9.22. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОГО НАЗАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ *CORYNEBACTERIUM PSEUDODIPHtheriticum* ШТАММ 090104

Смирнова Я.А.

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

Электронный адрес: sya005@yandex.ru

Находясь под влиянием различных стрессовых факторов в организме человека происходит снижение иммунологической и колонизационной резистентности, вследствие чего наблюдается активация условнопатогенной микробиоты и снижение количества облигатных представителей. Следствием этих изменений является увеличение риска развития острых воспалительных заболеваний, в том числе органов верхних дыхательных путей. Одним из возбудителей таких заболеваний является золотистый стафилококк - *Staphylococcus aureus*. В настоящее время для борьбы с этим условным патогеном широко применяют метициллин и мупиноцин. Также для лечения применяется стафилококковый бактериофаг. Однако, антибиотикотерапия далеко не всегда эффективна, так как: 1) существуют штаммы золотистого стафилококка, устойчивые к метициллину (MRSA штаммы); 2) под воздействием антибиотиков нарушается состав микробиоты, что приводит к микроэкологическому дисбалансу в организме человека; 3) происходит увеличение частоты встречаемости мутаций, приводящих к развитию антибиотикорезистентности у условнопатогенных представителей микробиоты человека. Следовательно, возникает необходимость разработки новой лекарственной формы, а именно создание назального препарата на основе микроорганизма, способного вытеснять *S.aureus*. В качестве такого микроорганизма может быть использован нормальный представитель микробиоты человека, колонизирующий слизистую носа и горла - *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* штамм 090104. В основе работы лежит разработка технологии изготовления пробиотического назального препарата с целью дальнейшего его применения в лечении и профилактике респираторных заболеваний, вызванных золотистым стафилококком. Разрабатываемый препарат будет представлять собой лиофилизированную форму, в состав которой входят вспомогательные вещества и иммобилизованные в них клетки микроорганизма. Входящие в состав вспомогательные вещества обеспечивают жизнеспособность клеток и образуют структуру, хорошо растворимую в физиологическом растворе и готовую к применению.

Таким образом, разрабатываемый препарат является новым представителем в существующем терапевтическом классе, так как содержит в своем составе пробиотический микроорганизм, способный вытеснить золотистого стафилококка, тем самым снижая риск развития острых воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей человека, не вызывая нарушений гомеостаза и функционирования микробиоты.

9.23. РАСПОЗНАВАНИЕ КАПСУЛИРОВАННЫХ БЕЛКОВ Т-КЛЕТКАМИ

Шербинина Т.С.¹, Варламов В.П.¹, Свирицевская Е.В.²

¹ Центр "Биоинженерия" РАН, Москва

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Электронный адрес: Tatyashcherbinina88@gmail.com

При разработке вакцин важным критерием эффективности вакцины является её способность стимулировать формирование Т-клеточного иммунного ответа. В данной работе были исследованы иммуногенные свойства белков, упакованных в полимерные наночастицы (NPs). В качестве модельного антигена использовали белок лактоферрин (Lf). Для получения полимерных наночастиц, содержащих модельный антиген Lf, использовали два типа упаковки Lf: из отрицательно заряженного сукциноилхитозана (SC, степень замещения 75%) и с дополнительной оболочкой из положительно заряженного хитозана (Chi, MM 10-20 кДа, степень деацетиляции 90%). Наночастицы Lf-NPs и Lf-SC-NPs формировали методом контролируемой термической обработки. Частицы получали сорбцией Chi на сформированных Lf-SC-NPs. Размер частиц Lf-NPs, Lf-SC-NPs и Lf-SC-Chi-NPs составил соответственно 150±30 нм, 250±50 нм и 500±100 нм. Для анализа иммунного ответа мышей линии C57BL/6 трехкратно иммунизировали 100 мкл суспензии частиц внутрибрюшинно с интервалом в 5 дней. Сыворотку крови забирали через 20 дней после первой иммунизации. Клетки пейеровых бляшек и селезенки получали через 15 дней после окончания иммунизации. С помощью иммуноферментного анализа с подложкой Lf показали, что частицы стимулировали образование IgG антител против Lf с равной эффективностью. Для анализа Т-клеточного ответа лимфоциты стимулировали *in vitro* Lf в разных концентрациях в присутствии и без дополнительных дендритных клеток (ДК), полученных из костного мозга мышей. Пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток оценивали на 3 сутки с помощью проточной цитометрии по анализу доли бластных клеток. Показали, что иммунизация Lf-SC-NPs приводила к неспецифической активации преимущественно CD4⁺ Т-клеток, истощению Lf-специфического ответа, а также сопровождалась снижением клеточности селезенки и лимфатических узлов. Иммунизация Lf-SC-Chi-NPs не вызывала неспецифической активации и сопровождалась достоверным увеличением доли активированных Lf-специфических CD8⁺ Т-клеток. Таким образом, показали, что капсулирование белков в различные полимеры может модифицировать иммунный ответ, в том числе стимулировать цитотоксический ответ, необходимый для разработки противовирусных вакцин.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абрамичева П.А.	146	Болосов И.А.	33, 128, 130
Ажикина Т.Л.	24	Большаков М.А.	115
Акасов Р.А.	42	Борис К.В.	37
Акимов М.Г.	5, 82	Бочкова Е.А.	118
Акопова Т.А.	153, 155	Брагин А.О.	73
Алексеев Г.В.	112	Бровко Ф.А.	60
Алексеева А.С.	7	Булаев А.Г.	119
Алексеева Л.Г.	103	Булахов А.Г.	120
Алиева Р.Р.	113	Бунин В.Д.	131
Алкон Н.С.	53	Бурлакова Д.О.	121
Андреев Я.А.	163, 165	Буров С.В.	42
Андреева Л.А.	159, 161	Бурьянов Я.И.	125
Андреева Т.В.	73	Бутовская М.Л.	77, 81
Андрианова А.Г.	61	Бутовская П.Р.	79
Антипова Н.В.	8	Бычкова В.Е.	67
Арапиди Г.П.	14	Варламов В.П.	168
Аронбаев С.Д.	85	Василевская А.В.	11
Аронов Д.А.	8	Василевский А.А.	12, 49, 65, 90
Арсеньев А.А.	65	Васильев В.А.	77, 81
Арсеньев А.С.	62	Васильева Н.В.	60
Артемова К.Г.	114	Вашукевич Е.А.	86
Архипова В.И.	55	Вейко В.П.	30
Афонников Д.А.	73	Величко А.К.	105
Ашба А.М.	82	Вергун А.А.	32, 81
Ашихмин А.А.	115	Веселова М.А.	102
Бакулев В.	34	Вигонт В.А.	13
Балакина Т.А.	146	Виноградов А.В.	148
Баландин С.В.	33, 58, 59, 125, 128	Виноградова С.В.	14, 116
Балобанов В.А.	67	Власов П.К.	158
Бальшева В.И.	129	Водовозова Е.Л.	7
Баранов М.С.	10, 50	Войтович Ю.В.	104
Баранова Ю.Г.	64	Воробьева Е.Е.	89
Баринаева Е.Д.	14, 116	Габибов А.Г.	9, 38, 40, 44
Барсуков М.И.	71, 78	Гайнетдинов И.В.	24
Безруких А.Е.	117	Галимова А.А.	122
Безуглов В.В.	5, 82	Галлингер Ю.О.	15
Белая И.А.	72	Ганнесен А.В.	100
Белецкий А.В.	21	Гарафутдинов Р.Р.	122
Белов А.А.	152	Гарбер М.Б.	55
Белоглазова И.Б.	39	Гедзун В.Р.	149
Белогуров А.А.	9	Генаев М.А.	73
Белый А.Ю.	56	Генералов А.А.	20, 101
Беркут А.А.	90	Генералова А.Н.	151
Бобик Т.В.	44	Гилеп А.А.	11
Бовин Н.В.	7	Гирнык А.Е.	32
Богданов И.В.	57, 68	Глуханок Е.В.	15
Богомолова А.П.	147	Глушанкова Л.Н.	13
Божанова Н.Г.	10	Гмошинский И.В.	137
Бойко А.А.	156		

Годакова С.А.	16	Жигалова Н.А.	19
Головин А.В.	40	Журина М.В.	100, 160
Гольцов А.Ю.	73	Завриев С.К.	142
Гороховатский А.Ю.	50	Зайцев Б.Д.	139
Граф А.В.	159, 161	Зайцев Ю.	101
Грецкая Н.М.	82	Зайцева Ю.В.	102
Гречихина М.В.	106	Закиев Е.Р.	14
Григоренко А.П.	73	Замолотчиков Р.Д.	108
Гринёв В.С.	43	Замятина Л.А.	159, 161
Гришин Е.В.	65, 90	Зарайский А.Г.	111
Гузъ А.В.	150	Захарова М.В.	110
Гулий О.И.	131, 139	Захарченко Н.С.	125
Гунбин К.В.	73	Звягин А.В.	151
Гусаков А.В.	120, 123	Звягин И.В.	96
Гусев Ф.Е.	73	Зеленецкий А.Н.	153, 155
Гусева К.А.	60	Зелепукин И.В.	126
Данилевич В.Н.	138	Зимин А.А.	70
Деев С.М.	48, 126, 151	Зими́на О.А.	13
Деменков П.С.	73	Злобина М.А.	155
Демина Т.С.	153, 155	Злобинов А.В.	127
Денисенко Ю.А.	123	Золотова Ю.	34
Джунушалиева А.Э.	151	Зубарева А.А.	20
Дзюба М.В.	23	Зубков Д.А.	156
Долгих Д.А.	67, 127	Зубкова Е.С.	39
Досадина Э.Э.	152	Зубов В.П.	151
Дрегваль О.А.	153	Зуев Ю.Ф.	35
Дреничев М.С.	17	Иванова Ю.Д.	128
Дроздова М.Г.	153, 155	Игнатов А.Н.	14
Дубинный М.А.	50	Игнатов В.В.	84
Дубовцева Е.С.	61	Игнатов О.В.	131, 139
Дуева Е.В.	22	Ильина Н.Б.	67
Духанина Е.В.	154	Иматдинов И.Р.	129
Дыкман Л.А.	45, 95, 131	Исмаилова А.М.	157
Дьяченко И.А.	162, 163, 165	Кадников В.В.	21
Дятлова Ю.А.	18	Казачкина Н.И.	136
Евстигнеева С.С.	84	Казначеева Е.В.	13
Емельянова А.А.	58	Калашников А.А.	130
Ермакова А.Я.	124	Калашникова М.Б.	59
Ерохин Ю.Е.	115	Каменский А.А.	159, 161
Ерохина М.В.	137, 143	Камионская А.М.	116
Ерохина С.А.	41, 93	Камнев А.А.	18
Ершов Н.И.	73	Каневский Л.М.	41
Есимбекова Е.Н.	117	Кантидзе О.Л.	105
Есипов Р.С.	114	Капкаева М.Р.	7
Ефремов Р.Г.	49	Караваева О.А.	131, 139
Женило С.В.	19	Карамян А.С.	164
Жердева В.В.	136	Каратовская А.П.	60
Живоговский Б.Д.	166	Карганова Г.Г.	22
		Кареткин Б.А.	69

Карначук О.В.	21	Литвиненко А.П.	89
Каськова З.М.	50	Литти Ю.В.	118
Касьяненко Н.	34	Локтюшов Е.В.	125
Каширина Е.И.	99, 103	Лощинина Е.А.	91
Керова К.В.	15	Лужин А.В.	105
Киргизова В.И.	73	Лукьянов К.А.	10
Князев А.Н.	14	Лымарь Ю.Г.	136
Князюк М.К.	135	Лысенко Ю.А.	154
Коваленко Е.И.	41, 93	Львов А.М.	25
Ковалицкая Ю.А.	116	Люкманова Е.Н.	26
Ковальчук С.И.	65	Мажорина М.А.	27
Ковтунов Е.А.	132	Макаревич П.И.	15
Козловская Л.И.	22	Маклакова А.С.	159, 161
Козяева В.В.	23	Максимов Д. А.	74
Кокшарова О.А.	102, 140	Малышев А. В.	149
Колегова А.С.	107	Мамченкова П.В.	28
Колобкова Ю.А.	13	Марданов А.В.	21
Колчанов Н.А.	73	Марк А.	42
Кондратьева С.А.	24	Марквичева Е.А.	42, 153, 155
Коннова С.А.	139	Мартьянов С.В.	160
Кононов А.И.	74	Маслова М.В.	159, 161
Корчагин В.И.	16	Масютин А.Г.	137, 143
Коршун В.А.	150	Матлашов М.Е.	29
Костюк С.В.	36	Махнева З.К.	115
Котлобай А.А.	50	Мачулин А.В.	138
Коцарева О.Д.	108	Меженный П.В.	95
Кошелев С.Г.	90	Мельник Б.С.	27
Кошкарова Л.А.	133	Мельникова Д.Н.	62, 68, 125
Красноштанова А.А.	69	Меньшиков М.Ю.	39
Кратасюк В.А.	117	Микулинская Г.В.	70
Кривых П.О.	158	Минеев К.С.	62
Куджасев А.М.	61	Минибаева Ф.В.	35
Кудрявцев Д.С.	92	Мирзоев Р.Р.	97
Кудряшева Н.С.	113	Митрофанов В.Г.	71
Кузнецов А.Г.	104	Митрошин И.В.	55
Кузнецова Н.Р.	7	Михайлов Н.В.	63
Кузьменков А.И.	49	Мишин А.С.	10
Кузьмин Д.В.	58, 59	Моисеева Е.В.	8
Куликов А.В.	166	Мокрушина Ю.А.	38
Куликов А.М.	71, 78	Молочков Н.В.	70
Куликов Е.В.	164	Мордкович Н.Н.	30
Кульдюшев Н.А.	90	Морозова Е.А.	87
Купряшина М.А.	134	Москаленко А.А.	115
Курко О.Д.	159, 161	Моторыкина Е.С.	159, 161
Кутузова Н.М.	71, 77-79	Музафаров Е.Н.	110
Ламова Я.А.	135	Мурашев А.Н.	157, 162, 163, 165
Лебедев Ю.Б.	96	Мырсилова Е.В.	106
Лежнин Ю.Н.	53	Мясоедов Н.Ф.	159, 161
Липасова В.А.	107, 140	Надеждин К.Д.	65
Липкин В.М.	89	Наделяева И.И.	29

Назаров В.И.	96	Постовская А.М.	98	Совкова И.В.	56	Хиразова Е.Э.	159, 161
Назарова О.	34	Прохоров А.В.	108	Созонова А.А.	63, 66	Хмель И.А.	102, 107, 140
Некрасова Т.	34	Прошаков П.А.	71, 78	Соколова Н.А.	159, 161	Царькова А.С.	50
Нетрусов А.И.	100	Ракитин А.Л.	124	Спирова Е.Н.	92	Цетлин В.И.	92
Нечаев А.В.	151	Ракитина Т.В.	89	Староверов С.А.	45, 95, 131	Цфасман И.М.	60
Никельшпарг Э.И.	31	Рамазанов Р.Р.	74	Стафеев Ю.С.	39	Чекунова А.И.	71, 78
Никитин М.П.	48, 126	Ревегук З.	34	Стахеев А.А.	142	Черткова Р.В.	67
Никитин П.И.	48, 126	Резайкин А.В.	148	Степаненко В.Н.	114	Чжан Цюши	112
Никитина В.Е.	91, 134	Решетов П.Д.	103	Степанова А.В.	38, 40	Чистов А.А.	150
Николаев А.И.	75	Рогаев Е.И.	73	Степанова Е.В.	7	Чихиржина Е.В.	63, 64, 66, 72
Новолаев Т. И.	76	Родина П.А.	15	Столбоушкина Е.А.	55	Чугунов А.О.	49
Ножевникова А.Н.	118	Родионова Н.С.	50	Стрельцова М.А.	41	Чудаков Д.Б.	99
Овчинникова Т.В.	33, 57-59, 62, 68, 125, 128, 130	Рожкова А.М.	123	Стрешнев Ф.П.	150	Чумаков С.П.	53
Оджомоко Л.О.	92	Ролич В.И.	63	Стукачева Е.А.	24, 68	Шаварда А.Л.	14
Огорокова Н.А.	30	Романов Н.М.	64	Султанов Д.Ч.	8	Шаврина М.С.	70
Омельченко А.В.	32	Романовская Д.Д.	65	Сумина А.М.	42	Шамборант О.Г.	44
Онищенко Г.Е.	137, 143	Руденко Н.В.	60	Суркина А.К.	43	Шандарин И. Н.	111
Орлов А.А.	22	Рычкова М.Е.	62	Суходольская Е.М.	77, 81	Шарипов Р.Р.	25
Осинникова Д.	88	Рябовол В.В.	35	Сычевская К.А.	143	Шаронов Г.В.	46
Осипов Д.О.	123	Рязанцев Д.Ю.	103	Тарасова Н.Б.	35	Шаронова Н.В.	89
Осипов Ф.А.	32	Савина А.А.	20, 101	Терехов С.С.	38, 44	Шебанова А.С.	137
Ословский В.Е.	17	Сазонов А.Э.	121	Терёшина М.Б.	111	Шевало И.	42
Осолодкин Д.И.	22	Сапожников А.М.	97, 98	Толстыко Е.А.	144	Шевченко М.А.	97, 98
Остерман И.А.	76	Сафонова Т.Н.	30	Травкина В.И.	88	Шелудько А.В.	132
Павлий С.А.	131, 139	Сахабутдинова А.Р.	122	Троянова Н.И.	97	Шелухина И.В.	92
Паликов В.А.	162, 163	Сачивкина Н.П.	164	Тугарова А.В.	18, 28	Шенкарев З.О.	47
Паликова Ю.А.	162, 163	Сачкова М.Ю.	65	Турчина А.И.	67	Шестибратов К.А.	116
Палюлин В.А.	22	Свирщевская Е.В.	20, 99, 101, 103, 104, 106, 108, 156, 168	Туховская Е.А.	157	Шингарова Л.Н.	127
Панарин Е.	34	Севастьянова Г.А.	16	Унксов И.Н.	145	Шипелин В.А.	137
Пантелеев П.В.	33, 58, 59, 128, 130	Семушина С.Г.	8	Успенский С.А.	153	Шипунова В.О.	48
Парфенова Е.В.	15, 39	Сергеев А.Г.	148	Устинов А.В.	150	Широкова А.И.	61
Пастон С.В.	75, 80	Сергеева В.А.	36	Фадеева И.В.	155	Ширшиков Ф.В.	49
Перцева М.А.	97	Сереев А.Г.	148	Файзуллин Д.А.	35	Шихабудинов А.М.	139
Першина А.Г.	121	Сереева В.А.	36	Фатхудинов Т.Х.	157	Шкель Т.В.	11
Петров С.В.	134	Сереежин И.Н.	141	Федоненко Ю.П.	84	Шрам С.И.	109
Петрова Л.П.	132	Серова О.В.	61	Феофанов А.В.	90	Шуленина О.В.	80
Петрова Т.Д.	8	Сивопляс Е.А.	71, 78	Фесенко И.А.	14	Шумилова Е.М.	132
Петровская Л.Е.	127	Сигида Е.Н.	84	Фехретдинова Д.И.	79	Шумская В.С.	19
Петросян Н.С.	77	Сизова С.В.	101	Филатова И.Ю.	110	Щеглов А.С.	29
Петушков В.Н.	50	Синицына И.А.	109	Филиппчева Ю.А.	132	Щегловитова О.Н.	7
Плакунов В.К.	100, 160	Скворцова Ю.В.	24	Финкина Е.И.	57, 62, 68, 125	Щеголев С.Ю.	45, 95
Плюта В.А.	102, 107, 140	Скобцова Л.А.	165	Фомин А.С.	45, 95, 131, 155	Щербакова О.И.	81
Погорелый М.В.	96	Слободкина Е.А.	166	Франк Ю.А.	21	Щербинина Т.С.	20, 101, 168
Полтева Е.Д.	69	Слугина М.А.	37	Фурс О.В.	125	Ямпольский И.В.	50
Полшков В.	34	Смирнов И.В.	38, 40, 44, 162	Хабибулина Н.В.	69	Яхно Т.А.	117
Поляков К.М.	30	Смирнова Е.А.	137, 143	Хазигалеева Р.А.	14		
Поляничко А.М.	63, 64, 66, 72	Смирнова Е.В.	89, 156	Хайдуков Е.В.	151		
Пономаренко Н.А.	38, 40, 44	Смирнова О.В.	146	Хайрутдинов Б.И.	35		
Попова А.А.	140	Смирнова Я.А.	167				

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

ЭНДОКАННАБИНОИДЫ И ЭНДОВАНИЛОИДЫ: КАК ЛИПИДЫ ЗАЩИЩАЮТ НАС ОТ РАКА <i>Акимов М.Г., Безуглов В.В.</i>	5
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛИПОСОМ, НЕСУЩИХ ЛИГАНД СЕЛЕКТИНОВ, С ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ СОСУДОВ КРОВИ <i>Алексеева А.С., Кузнецова Н.Р., Капкаева М.Р., Щегловитова О.Н., Степанова Е.В., Бовин Н.В., Водовозова Е.Л.</i>	7
ВЛИЯНИЕ ИМУНОФАНА НА КРАТКОСРОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЯ <i>IN VITRO</i> <i>Аронов Д.А., Антипова Н.В., Петрова Т.Д., Султанов Д.Ч., Семушина С.Г., Моисеева Е.В.</i>	8
УБИКВИТИН-НЕЗАВИСИМЫЙ ПРОТЕОЛИЗ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА ПРОТЕАСОМОЙ И ЕГО РОЛЬ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ <i>Белогуров А.А., Габибов А.Г.</i>	9
СОЗДАНИЕ БЕЛКОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХ ФЛУОРОГЕНЫ, ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕЧЕНИЯ ЖИВЫХ СИСТЕМ <i>Божанова Н.Г., Баранов М.С., Лукьянов К.А., Мишин А.С.</i>	10
ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА МОНООКСИГЕНАЗ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : СУР124 И СУР136 <i>Василевская А.В., Шкель Т.В., Гилеп А.А.</i>	11
ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ ТОКСИНОВ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНСТРУМЕНТОВ В НЕЙРОБИОЛОГИИ <i>Василевский А.А.</i>	12
ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ-МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА <i>Вигонт В.А., Колобкова Ю.А., Зимина О.А., Глушанкова Л.Н., Казначеева Е.В.</i>	13
НОВЫЙ МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАСТЕНИЙ И ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ <i>Виноградова С.В., Баринова Е.Д., Князев А.Н., Арапиди Г.П., Фесенко И.А., Закиев Е.Р., Хазигалеева Р.А., Шаварда А.Л., Игнатов А.Н.</i>	14
ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ ХЕМОКИНОВ ЭНДОТЕЛИЕМ ЧЕЛОВЕКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ VEGF165 И HGF <i>Глуханюк Е.В., Галлингер Ю.О., Родина П.А., Керова К.В., Макаревич П.И., Парфенова Е.В.</i>	15
СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ АП-ЭНДОНУКЛЕАЗЫ И ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ РЕТРОТРАНСПОЗОНА <i>Bov-B LINE</i> ГЕНОМА ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЯЩЕРИЦ <i>DAREVSKIA UNISEXUALIS</i> И ДВУПОЛЫХ РОДИТЕЛЬСКИХ ВИДОВ <i>D.NAIRENSIS</i> И <i>D.VALENTINI</i> <i>Годакова С.А., Корчагин В.И., Севастьянова Г.А.</i>	16

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДИСАХАРИДНЫЕ НУКЛЕОЗИДЫ. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА <i>Дреничев М.С., Ословский В.Е.</i>	17
ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИ-3-ГИДРОКСОБУТИРАТА, СИНТЕЗИРУЕМОГО РИЗОБАКТЕРИЕЙ <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> Sp245 <i>Дятлова Ю.А., Тугарова А.В., Камнев А.А.</i>	18
НАДГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ У ПОЗВОНОЧНЫХ <i>Жигалова Н.А., Шумская В.С., Женило С.В.</i>	19
ХИТОЗАН – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПОЛИМЕР ДЛЯ СОЗДАНИЯ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ <i>Зубарева А.А., Савина А.А., Щербинина Т.С., Генералов А.А., Свирцевская Е.В.</i>	20
МЕТАГЕНОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОДЗЕМНОЙ БИОСФЕРЫ <i>Кадников В.В., Франк Ю.А., Белецкий А.В., Карначук О.В., Марданов А.В.</i>	21
МОДЕЛИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ БЕЛКОВ ОБОЛОЧКИ ФЛАВИВИРУСОВ <i>Козловская Л.И., Осолодкин Д.И., Дуева Е.В., Орлов А.А., Палулин В.А., Карганова Г.Г.</i>	22
ВЫДЕЛЕНИЕ, ОПИСАНИЕ И ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ НОВЫХ ШТАММОВ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ <i>Козяева В.В., Дзюба М.В.</i>	23
БЕЛОК <i>PIWI2</i> КАК МАРКЕР ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ГЕРМИНОГЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧКА <i>Кондратьева С.А., Гайнетдинов И.В., Скворцова Ю.В., Стукачева Е.А., Ажикина Т.Л.</i>	24
НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПЕПТИДА <i>Pro-Gly-Pro</i> НА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ЭКСАЙТОТОКСИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙРОНОВ <i>Львов А.М., Шарипов Р.Р.</i>	25
ТОКСИН-ПОДОБНЫЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА <i>LY-6/uPAR</i> : ОТ МОДУЛЯЦИИ РЕЦЕПТОРОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ДО ПАРАКРИННОЙ/АУТОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ <i>Люкманова Е.Н.</i>	26
ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ И СКОРОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЙ МУТАНТНЫХ ФОРМ АПОМИОГЛОБИНА С ЗАМЕНАМИ АМИНОКИСЛОТ НА ПОВЕРХНОСТИ БЕЛКА <i>Мажорина М.А., Мельник Б.С.</i>	27
СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА БАКТЕРИЕЙ <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> Sp245 И ИХ ВЫДЕЛЕНИЕ <i>Мамченкова П.В., Тугарова А.В.</i>	28
БИОМЕДИЦИНСКИЕ КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ: ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ <i>Матлашов М.Е., Щеглов А.С., Надеяева И.И.</i>	29

РОЛЬ ИОНОВ ЩЕЛОЧНЫХ МЕТАЛЛОВ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ УРИДИНФОСФОРИЛАЗЫ <i>Мордкович Н.Н., Окорокова Н.А., Сафонова Т.Н., Поляков К.М., Вейко В.П.</i>	30
СПЕКТРОСКОПИЯ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ ЦИТОХРОМА <i>c</i> ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ ИНТАКТНЫХ МИТОХОНДРИЙ <i>Никельшпарг Э.И.</i>	31
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ КОМПЛЕКСА ЯЩЕРИЦ <i>DAREVSKIA RADDEI</i> НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА <i>Осипов Ф.А., Гирнык А.Е., Вергун А.А., Омельченко А.В.</i>	32
АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ КАК ФАКТОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА <i>Пантелеев П.В., Болосов И.А., Баландин С.В., Овчинникова Т.В.</i>	33
ФОРМИРОВАНИЕ ГЕННЫХ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ ДНК-ПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ С ВКЛЮЧЕНИЕМ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА <i>Поликов В., Ревезук З., Бакулев В., Назарова О., Некрасова Т., Золотова Ю., Панарин Е., Касьяненко Н.</i>	34
АУТОФАГИЧЕСКИЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА ATG8 <i>TRITICUM AESTIVUM</i> : ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ <i>Рябовол В.В., Файзуллин Д.А., Хайрутдинов Б.И., Тарасова Н.Б., Зуев Ю.Ф., Минибаева Ф.В.</i>	35
ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ [C60] Фуллеренов НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ И НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА <i>Сергеева В.А., Костюк С.В.</i>	36
ГЕНЫ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА РАСТЕНИЙ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ФИЛОГЕНИЯ, ЭВОЛЮЦИЯ <i>Слугина М.А., Борис К.В.</i>	37
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМБИНАЦИИ МЕТОДОВ КОМБИНАТОРНОЙ ХИМИИ И БИОЛОГИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ <i>Смирнов И.В., Мокрушина Ю.А., Степанова А.В., Терехов С.С., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г.</i>	38
ПРОТИВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 9 ТИПА, ИНДУЦИРУЕМОЙ УРОКИНАЗОЙ, В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ТНР-1 <i>Стафеев Ю.С., Меньшиков М.Ю., Зубкова Е.С., Белоглазова И.Б., Парфенова Е.В.</i>	39
РАЗРАБОТКА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО МЕТОДА СОЗДАНИЯ МУТАНТНЫХ ФОРМ КАТАЛИТИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА С ЗАДАННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ ПО ОТНОШЕНИЮ К ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМ ТОКСИНАМ <i>Степанова А.В., Смирнов И.В., Головин А.В., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г.</i>	40

NK-КЛЕТКИ С ФЕНОТИПОМ CD56 ^{bright} HLA-DR ⁺ CD16 ⁺ CD57 ⁻ ОБЛАДАЮТ ВЫСОКОЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ СПОСОБНОСТЬЮ <i>Стрельцова М.А., Ерохина С.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И.</i>	41
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК В МИКРОКАПСУЛАХ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ <i>Сумина А.М., Акасов Р.А., Буров С.В., Шевало И., Марк А., Марквичева Е.А.</i>	42
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НАТИВНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ <i>NIVEISPIRILLUM IRAKENSE</i> <i>Суркина А.К., Гринёв В.С.</i>	43
НОВЫЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА С УЛУЧШЕННЫМИ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОТРАВЛЕНИЙ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ ТОКСИНАМИ <i>Терехов С.С., Смирнов И.В., Шамборант О.Г., Бобик Т.В., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г.</i>	44
ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ К ТУБЕРКУЛИНУ, ИММУНОАНАЛИЗА МИКОБАКТЕРИЙ И ВАКЦИНАЦИИ ЖИВОТНЫХ <i>Фомин А.С., Староверов С.А., Щеголев С.Ю., Дыкман Л.А.</i>	45
БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ НАВИГАЦИИ КЛЕТОК <i>Шаронов Г.В.</i>	46
ПОТЕНЦИАЛОЗАВИСИМЫЕ КАТИОННЫЕ КАНАЛЫ: ОТ СТРУКТУРЫ ОТДЕЛЬНЫХ ДОМЕНОВ ДО МЕХАНИЗМОВ РАБОТЫ И РЕГУЛЯЦИИ <i>Шенкарев З.О.</i>	47
ГИБРИДНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДОСТАВКИ К КЛЕТКАМ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i> <i>Шипунова В.О., Никитин М.П., Никитин П.И., Деев С.М.</i>	48
ФАРМАКОФОРНЫЕ МОДЕЛИ ПОЛИПЕПТИДНЫХ НЕЙРОТОКСИНОВ ЯДА СКОРПИОНОВ <i>Ширшиков Ф.В., Кузьменков А.И., Василевский А.А., Чугунов А.О., Ефремов Р.Г.</i>	49
НОВАЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ СИСТЕМА ЧЕРВЯ <i>FRIDERICIA HELIOTA</i> <i>Ямпольский И.В., Дубинный М.А., Царькова А.С., Петушков В.Н., Родионова Н.С., Каськова З.М., Баранов М.С., Гореховатский А.Ю., Котлобай А.А.</i>	50

ТЕЗИСЫ СТЕНДОВЫХ СООБЩЕНИЙ

СЕКЦИЯ 1

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ. БИОКАТАЛИЗ

- 1.1. ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ПРОДУЦЕНТА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 (IL-4)
Алкон Н.С., Лежнин Ю.Н., Чумаков С.П. 53
- 1.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ЭУКАРИОТИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ ИНИЦИИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eIF2БЕТА И eIF5
Архипова В.И., Митрошин И.В., Столбоушкина Е.А., Гарбер М.Б. . 55
- 1.3. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА АДФ-РИБОЗИЛИРОВАНИЯ АКТИНА ЙОТА-ТОКСИНОМ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*
Белый А.Ю., Совкова И.В. 56
- 1.4. ИЗУЧЕНИЕ НОВОГО ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА ГОРОХА PS-LTR1
Богданов И.В., Финкина Е.И., Овчинникова Т.В. 57
- 1.5. СРАВНЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ГОМЕЗИНА И ТАХИПЛЕЗИНА
Емельянова А.А., Кузьмин Д.В., Пантелеев П.В., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. 58
- 1.6. ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АРЕНИЦИНА
Калашиникова М.Б., Кузьмин Д.В., Пантелеев П.В., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. 59
- 1.7. ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ЭНДОПЕПТИДАЗЫ Л1 *LYSOBACTER* sp. XL1
Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Гусева К.А., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. 60
- 1.8. РОЛЬ N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА АТР-ЗАВИСИМОЙ Lon-ПРОТЕАЗЫ ИЗ *E. COLI* В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ФЕРМЕНТА И В СВЯЗЫВАНИИ ДНК
Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Широкова А.И., Серова О.В., Андрианова А.Г. 61
- 1.9. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА УКРОПА ОГОРОДНОГО *ANETHUM GRAVEOLENS*
Мельникова Д.Н., Минеев К.С., Рычкова М.Е., Финкина Е.И., Арсеньев А.С., Овчинникова Т.В. 62
- 1.10. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ ОПТИЧЕСКИМИ И ГИДРОДИНАМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ
Михайлов Н.В., Созонова А.А., Ролич В.И., Чихиржина Е.В., Поляничко А.М. 63

- 1.11. ИЗУЧЕНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ BSA И H1 МЕТОДАМИ ИК- И КД-СПЕКТРОСКОПИИ
Романов Н.М., Баранова Ю.Г., Чихиржина Е.В., Поляничко А.М. 64
- 1.12. МЕТОД СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР В ИССЛЕДОВАНИИ ПАУЧЬИХ ЯДОВ НА ПРИМЕРЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ЦИТОЛИТИЧЕСКОГО N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА БЕЛКА OtTx1a
Романовская Д.Д., Надеждин К.Д., Сачкова М.Ю., Ковальчук С.И., Василевский А.А., Гришин Е.В., Арсеньев А.А. 65
- 1.13. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИНКЕРНОГО ГИСТОНА H1 С НЕГИСТОНЫМ БЕЛКОМ HMGV1 ГИДРОДИНАМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ
Созонова А.А., Чихиржина Е.В., Поляничко А.М. 66
- 1.14. ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛЬБЕБЕТИНА ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА ЕГО АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛАХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ
Турчина А.И., Ильина Н.Б., Черткова Р.В., Долгих Д.А., Бычкова В.Е., Балобанов В.А. 67
- 1.15. ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ИЗОФОРМ АЛЛЕРГЕНА ЧЕЧЕВИЦЫ Len c 3
Финкина Е.И., Богданов И.В., Стукачева Е.А., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. 68
- 1.16. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛОВ ДЛЯ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПОЛУЧЕНИЯ ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЛКОВОЙ И УГЛЕВОДНОЙ ПРИРОДЫ ИЗ СОЕВОЙ МУКИ
Хабибулина Н.В., Красноштанова А.А., Полтева Е.Д., Кареткин Б.А. 69
- 1.17. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРУ ЭНДОЛИЗИНА БАКТЕРИОФАГА T5
Шаврина М.С., Молочков Н.В., Зимин А.А., Микулинская Г.В. 70

СЕКЦИЯ 2

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

- 2.1. ОСОБЕННОСТИ ЭВОЛЮЦИИ 3'-UTR ДЛЯ ГЕНА *Dras1* У ДРОЗОФИЛ ГРУППЫ *VIRILIS* И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИ УДАЛЕННЫХ ВИДОВ
Барсуков М.И., Сивопляс Е.А., Кутузова Н.М., Прошаков П.А., Чекунова А.И., Куликов А.М., Митрофанов В.Г. 71
- 2.2. ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДИХЛОРОДИАММИНПЛАТИНЫ(II) С ДНК И БЕЛКАМИ ХРОМАТИНА
Белая И.А., Чихиржина Е.В., Поляничко А.М. 72
- 2.3. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСНОВ СОЦИАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ГЕНОВ СЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫХ ЛИНИЙ ЛИС
Киргизова В.И., Андреева Т.В., Генаев М.А., Брагин А.О., Григоренко А.П., Гусев Ф.Е., Гунбин К.В., Деменков П.С., Афонников Д.А., Гольцов А.Ю., Ершов Н.И., Колчанов Н.А., Рогаев Е.И. 73

2.4.	РАСЧЕТ ЭЛЕКТРОННЫХ СПЕКТРОВ ВОЗБУЖДЕНИЯ НЕКАНОНИЧЕСКИХ КОНФОРМАЦИЙ ДИМЕРОВ ПИРИМИДИНОВЫХ АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ <i>Максимов Д.А., Рамазанов Р.Р., Кононов А.И.</i>	74
2.5.	АССОЦИАЦИЯ И ФОТОПРЕВРАЩЕНИЯ ТИМИДИНА В РАСТВОРАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА <i>Николаев А.И., Пастон С.В.</i>	75
2.6.	TRAR (tRNA-ASSOCIATED REPEATS) – КОРОТКИЕ ПОВТОРЫ ДНК С НЕИЗВЕСТНОЙ ФУНКЦИЕЙ <i>Новолаев Т.И., Остерман И.А.</i>	76
2.7.	ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ОКСИТОЦИНОВОГО РЕЦЕПТОРА (OXTR, rs53576) У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ АФРИКАНСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ ХАДЗА И ДАТОГА <i>Петросян Н.С., Суходольская Е.М., Кутузова Н.М., Бутовская М.Л., Васильев В.А.</i>	77
2.8.	ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ТОЧКИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНА <i>Dras1</i> У ДРОЗОФИЛ ГРУППЫ <i>VIRILIS</i> И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИ УДАЛЕННЫХ ВИДОВ <i>Сивоняц Е.А., Барсуков М.И., Чекунова А.И., Прошаков П.А., Кутузова Н.М., Куликов А.М.</i>	78
2.9.	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СЕРТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ (5-HTT, 5-HT1A, 5-HT2A И MAOA) КАК ИНДИКАТОР УСПЕШНОСТИ У СПОРТСМЕНОВ СИЛОВЫХ ВИДОВ СПОРТА <i>Фехретдинова Д.И., Кутузова Н.М., Бутовская П.Р.</i>	79
2.10.	ИЗУЧЕНИЕ ПЛЕНОК ДНК МЕТОДОМ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ <i>Шуленина О.В., Пастон С.В.</i>	80
2.11.	ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ТРЕХ ГЕНОВ СЕРТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ (5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT1B) У МУЖЧИН В ПОПУЛЯЦИЯХ ХАДЗА И ДАТОГА <i>Щербатова О.И., Суходольская Е.М., Бутовская М.Л., Вергун А.А., Васильев В.А.</i>	81

СЕКЦИЯ 3

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ, ЛИПИДОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ

3.1.	ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АЦИЛДОФАМИНОВ НА КЛЕТКИ ФЕОХРОМОЦИТОМЫ PC12 <i>Ашба А.М., Акимов М.Г., Грецкая Н.М., Безуглов В.В.</i>	82
3.2.	ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТАВА ГЛИКОПОЛИМЕРОВ ПОВЕРХНОСТИ БАКТЕРИЙ <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> Sp7 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА <i>Евстигнеева С.С., Сигида Е.Н., Федоненко Ю.П., Игнатов В.В.</i>	84

СЕКЦИЯ 4

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

4.1.	ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ АКТИВНЫХ ГРУПП БИОПОЛИМЕРОВ КЛЕТОЧНЫХ СТенок ПИВОВАРЕННЫХ ДРОЖЖЕЙ МЕТОДОМ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ <i>Аронбаев С.Д.</i>	85
4.2.	ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ AEDG И AEDL С ДНК В РАСТВОРЕ <i>Вашукевич Е.А.</i>	86
4.3.	СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ С ДНК <i>IN VITRO</i> <i>Морозова Е.А.</i>	87
4.4.	МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОХИНОЛИНА С ДНК <i>Травкина В.И., Осинникова Д.</i>	88

СЕКЦИЯ 5

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЗНАВАНИЯ БИОМОЛЕКУЛ И ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В КЛЕТКЕ

5.1.	ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГАПОНИНА В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ НА УРОВНЕ ТРАНСКРИПЦИИ <i>Воробьева Е.Е., Шаронова Н.В., Литвиненко А.П., Ракитина Т.В., Смирнова Е.В., Липкин В.М.</i>	89
5.2.	ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНЫЙ ЛИГАНД ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ <i>Кульдюшев Н.А., Беркут А.А., Кошелев С.Г., Гришин Е.В., Феофанов А.В., Василевский А.А.</i>	90
5.3.	СИНТЕЗ МАРКЕРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ NO-СИНТАЗНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ГЛУБИННЫМИ КУЛЬТУРАМИ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ <i>LENTINUS EDODES</i> И <i>GRIFOLA FRONDOSA</i> В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ <i>Лоцинина Е.А., Никитина В.Е.</i>	91
5.4.	МЕТОД СКРИНИНГА СПЕЦИФИЧНОСТИ МУТАНТНЫХ ФОРМ $\alpha 7$ nAHP НА ОСНОВЕ КАЛЬЦИЕВОГО ИМИДЖИНГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО СЕНСОРА Case12 <i>Спирова Е.Н., Шелухина И.В., Кудрявцев Д.С., Оджомоко Л.О., Цетлин В.И.</i>	92

СЕКЦИЯ 6

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ИММУНИТЕТА

6.1.	ХАРАКТЕРИСТИКА HLA-DR-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ НК-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧЕННЫХ В УСЛОВИЯХ СТИМУЛЯЦИИ IL-2 И МЕМБРАНОСВЯЗАННЫМ IL-21 <i>Ерохина С.А., Коваленко Е.И.</i>	93
------	--	----

6.2.	ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ВИРУСА ЯЩУРА, КОНЬЮГИРОВАННОГО С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА, ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНАЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ <i>Меженный П.В., Фомин А.С., Щеголев С.Ю., Дыкман Л.А., Староверов С.А.</i> 95	95
6.3.	АЛГОРИТМ ДЛЯ ВЫЧИСЛЕНИЯ ПОЛНЫХ ВЕРОЯТНОСТЕЙ СБОРКИ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ АЛЬФА-БЕТА ЦЕПЕЙ <i>Назаров В.И., Погорельный М.В., Звягин И.В., Лебедев Ю.Б., Мамедов И.З.</i> 96	96
6.4.	КОНТАМИНАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО БТШ70 БАКТЕРИАЛЬНЫМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ ПОДАВЛЯЕТ ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЭТОГО ПРОТЕИНА НА ПРОДУКЦИЮ ФАГОЦИТАМИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА <i>Перцева М.А., Троянова Н.И., Мирзоев Р.Р., Шевченко М.А., Сапожников А.М.</i> 97	97
6.5.	ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА 70 КДА ВЛИЯТЬ НА ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ СЕТЕЙ (NETs) НЕЙТРОФИЛАМИ КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ <i>Постовская А.М., Сапожников А.М., Шевченко М.А.</i> 98	98
6.6.	УРОВЕНЬ Der f 2 СПЕЦИФИЧНЫХ IgG, И IgE В СЫВОРОТКАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ С АЛЛЕРГИЕЙ НА КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ <i>Чудаков Д.Б., Каширина Е.И., Свирицкая Е.В.</i> 99	99

СЕКЦИЯ 7

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

7.1.	УЧАСТИЕ СИСТЕМЫ QUORUM SENSING В ПРОЦЕССЕ СТИМУЛЯЦИИ АЗИТРОМИЦИНОМ РОСТА БИОПЛЕНОК <i>PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS</i> 449 <i>Ганнесен А.В., Журина М.В., Плакунов В.К., Нетрусов А.И.</i> 100	100
7.2.	ИЗУЧЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА С РАЗНЫМИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ С ПОМОЩЬЮ ФОТОАКТИВИРУЕМОГО КРАСИТЕЛЯ <i>Генералов А.А., Савина А.А., Щербинина Т.С., Сизова С.В., Зайцев Ю., Свирицкая Е.В.</i> 101	101
7.3.	QUORUM SENSING РЕГУЛЯЦИЯ У <i>BURKHOLDERIA CENOCERASIA</i> 370 И ЕЕ УЧАСТИЕ В КОНТРОЛЕ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ <i>Зайцева Ю.В., Веселова М.А., Плюта В.А., Кокишарова О.А., Хмель И.А.</i> 102	102
7.4.	МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КАПСУЛИРОВАННЫХ ВАКЦИН ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АЛЛЕРГИИ НА КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ <i>Каширина Е.И., Решетов П.Д., Рязанцев Д.Ю., Алексеева Л.Г., Свирицкая Е.В.</i> 103	103
7.5.	ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ ИЗОКОЛХИЦИНОИДОВ С ХИТОЗАНОМ <i>Кузнецов А.Г., Войтович Ю.В., Свирицкая Е.В.</i> 104	104

7.6.	ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗЫ II В ОБРАЗОВАНИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ТЕПЛОВЫМ ШОКОМ ДВУЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК <i>Лужин А.В., Кантидзе О.Л., Величко А.К.</i> 105	105
7.7.	НОВЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В 2D И 3D УСЛОВИЯХ <i>Мырсинова Е.В., Гречихина М.В., Свирицкая Е.В.</i> 106	106
7.8.	ДЕЙСТВИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА БИОПЛЕНКИ БАКТЕРИЙ <i>Плюта В.А., Колегова А.С., Липасова В.А., Хмель И.А.</i> 107	107
7.9.	ЭКСПРЕССИЯ АУТОАНТИГЕНА ПУЗЫРЧАТКИ ДЕСМОГЛЕИНА 3 В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ <i>Прохоров А.В., Коцарева О.Д., Замолодчиков Р.Д., Свирицкая Е.В.</i> 108	108
7.10.	ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КАРДИОМИОБЛАСТАХ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ <i>Синицына И.А., Шрам С.И.</i> 109	109
7.11.	БЕЛОК SGPR ШТАММА <i>P. PUTIDA</i> AK5 – НОВЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ <i>LysR</i> -СЕМЕЙСТВА РЕГУЛЯТОРОВ ГЕНОВ ДЕГРАДАЦИИ САЛИЦИЛАТА <i>Филатова И.Ю., Музафаров Е.Н., Захарова М.В.</i> 110	110
7.12.	ГЕНЫ СЕМЕЙСТВ <i>Agtr</i> И <i>Ras-dva</i> УЧАСТВУЮТ В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ У НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ <i>Шандарин И.Н., Зарайский А.Г., Терёшина М.Б.</i> 111	111

СЕКЦИЯ 8

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ

8.1.	ТЕСТИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО СОЕДИНЕНИЯ ПЛАТИНЫ НА МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ <i>Алексеев Г.В., Чжан Цюши</i> 112	112
8.2.	ВЛИЯНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ РАЗРЯЖЕННОГО ФОТОПРОТЕИНА ОБЕЛИНА <i>Алиева Р.Р., Кудряшева Н.С.</i> 113	113
8.3.	РАЗРАБОТКА ПИЛОТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНАЛОГОВ ЛАКТАПТИНА RL2SH И RL2S <i>Артемюва К.Г., Степаненко В.Н., Есипов Р.С.</i> 114	114
8.4.	ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ КАРОТИНОИДГЕНЕЗА КАК ПОДХОД ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕСКАРОТИНОИДНЫХ ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ У ПУРПУРНЫХ СЕРНЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ <i>Ашихмин А.А., Большаков М.А., Махнева З.К., Ерохин Ю.Е., Москаленко А.А.</i> 115	115

- 8.5. ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА 4-КУМАРАТ-КоА-ЛИГАЗЫ В РАСТЕНИЯХ ОСИНЫ (*POPULUS TREMULA L.*) НА ЕЕ УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИТОПАТОГЕННЫМ БАКТЕРИЯМ
Барينو́ва Е.Д., Виноградова С.В., Ковалицкая Ю.А., Шестибратов К.А., Камюнская А.М. 116
- 8.6. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ В ЖЕЛАТИНОВЫХ И КРАХМАЛЬНЫХ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ РЕАГЕНТАХ ДЛЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА
Безруких А.Е., Есимбекова Е.Н., Кратасюк В.А., Яхно Т.А. 117
- 8.7. ДИНАМИКА ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЁНОК АНАММОКС-БАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ ПРОТОЧНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В АНАЭРОБНОМ ЛАБОРАТОРНОМ БИОРЕАКТОРЕ
Бочкова Е.А., Литти Ю.В., Ножевникова А.Н. 118
- 8.8. РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП АЦИДОФИЛЬНЫХ УМЕРЕННО ТЕРМОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ОКИСЛЕНИИ ПИРИТА
Булаев А.Г. 119
- 8.9. ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДМОНООКСИГЕНАЗ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГРИБНЫХ ЦЕЛЛЮЛАЗ
Булахов А.Г., Гусаков А.В. 120
- 8.10. ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ПЕПТИДА UBI₁₈₋₃₅ В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ
Бурлакова Д.О., Першина А.Г., Сазонов А.Э. 121
- 8.11. СИСТЕМА СБЛИЖЕННЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА "СЛОЖНЫХ" БИООБЪЕКТОВ МЕТОДОМ ПЦР
Галимова А.А., Сахабутдинова А.Р., Гарафутдинов Р.Р. 122
- 8.12. ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ МУТАНТОВ ЭНДО-1,4-β-КСИЛАНАЗЫ *PENICILLIUM CANESCENS*
Денисенко Ю.А., Гусаков А.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О. 123
- 8.13. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КСИЛАНАЗ БАКТЕРИИ *MELIORIBACTER ROSEUS* P3M-2
Ермакова А.Я., Ракитин А.Л. 124
- 8.14. ПОВЫШЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА К ФИТОПАТОГЕНАМ, ОБУСЛОВЛЕННАЯ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА АРЕНИЦИНА-2
Захарченко Н.С., Локтюшов Е.В., Мельникова Д.Н., Финкина Е.И., Баландин С.В., Фурс О.В., Овчинникова Т.В., Бурьянов Я.И. 125
- 8.15. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВВЕДЕНИЯ ВЫСОКИХ ДОЗ НАНОЧАСТИЦ НА ИХ ФАРМАКОКИНЕТИКУ
Зелепукин И.В., Никитин М.П., Никитин П.И., Деев С.М. 126
- 8.16. РАЗРАБОТКА МЕТОДА КЛЕТОЧНОГО ДИСПЛЕЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИСКУССТВЕННЫХ ФНО-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ
Злобинов А.В., Петровская Л.Е., Шингарова Л.Н., Долгих Д.А. 127
- 8.17. БИОИНЖЕНЕРИЯ УКРОЧЕННЫХ АНАЛОГОВ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АРЕНИЦИНА
Иванова Ю.Д., Пантелеев П.В., Болосов И.А., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. 128
- 8.18. ДИЗАЙН И КОНСТРУИРОВАНИЕ ИСКУССТВЕННОГО ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО ПОЛИЭПИТОПНЫЙ ПОЛИПЕПТИД, СОСТОЯЩИЙ ИЗ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ИИМУНОДОМИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ДОЛИНЫ РИФТ
Иматдинов И.Р., Бальшиева В.И. 129
- 8.19. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АРЕНИЦИНА-2 НА АКТИВНОСТЬ КОНВЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИБИОТИКОВ ПРИ ИХ СОВМЕСТНОМ ПРИМЕНЕНИИ
Калашиников А.А., Болосов И.А., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В. 130
- 8.20. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАГОВЫХ МИНИАНТИТЕЛ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Sp245 МЕТОДОМ ЭЛЕКТРООПТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
Караваева О.А., Гулий О.И., Дыкман Л.А., Староверов С.А., Фомин А.С., Павлий С.А., Бунин В.Д., Игнатов О.В. 131
- 8.21. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* СЕРОГРУППЫ I С СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫМИ РАСТЕНИЯМИ
Ковтунов Е.А., Филипьевичева Ю.А., Шелудько А.В., Шумилова Е.М., Петрова Л.П. 132
- 8.22. ВЛИЯНИЕ МЕТАНА И ДВУОКСИ УГЛЕРОДА НА РАБОТУ ФЕРМЕНТНОГО ЭЛЕКТРОДА НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕНАЗЫ
Кошкарлова Л.А. 133
- 8.23. ЛИГНИНДЕГРАДИРУЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПЕРОКСИДАЗ ФЕНОЛОКСИЛЯЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ЭНДОФИТНОЙ БАКТЕРИИ *A. BRASILENSE*
Купряшина М.А., Петров С.В., Никитина В.Е. 134
- 8.24. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ДИНАМИКУ РОСТА ПСИХРОФИЛЬНЫХ УГЛЕВОДОРОДОКСИЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ
Ламова Я.А., Князюк М.К. 135
- 8.25. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БИОИМИДЖИНГА ДЛЯ МОНИТОРИНГА ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОПУХОЛЕЙ В ПРОЦЕССЕ ИХ РОСТА
Льмарь Ю.Г., Казачкина Н.И., Жердева В.В. 136
- 8.26. ДЕТЕКЦИЯ АГРЕГАТОВ ФуЛЛЕРЕНОВ C₆₀ И ВЫЗЫВАЕМЫХ ИМИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОРГАНАХ КРЫСЫ МЕТОДАМИ ТРАНСМИССИОННОЙ (ТЭМ) И АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ (анЭМ)
Масютин А.Г., Ерохина М.В., Шебанова А.С., Шипелин В.А., Смирнова Е.А., Гмошинский И.В., Онищенко Г.Е. 137

8.27.	К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ ФОРМИРОВАНИЯ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ МИКРОЧАСТИЦ В ХОДЕ ПЦР: КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ ПИРОФОСФАТА МАГНИЯ <i>Мачулин А.В., Данилевич В.Н.</i>	138
8.28.	ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ЭЛЕКТРОАКУСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК К БАКТЕРИОФАГАМ <i>Павлий С.А., Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Шихабудинов А.М., Караваява О.А., Коннова С.А., Игнатов О.В.</i>	139
8.29.	СИНТЕЗ И ДЕЙСТВИЕ ЦИАНИДА И ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ НА МИКРООРГАНИЗМЫ, ДРОЗОФИЛУ, НЕМАТОДЫ <i>Попова А.А., Плюта В.А., Липасова В.А., Кокишарова О.А., Хмель И.А.</i>	140
8.30.	РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ ЭКСПРЕСС-МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ <i>Сережкин И.Н.</i>	141
8.31.	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД В СИСТЕМАТИКЕ ТОКСИГЕННЫХ ГРИБОВ-ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФУЗАРИОЗА ЗЕРНА <i>Стахеев А.А., Завриев С.К.</i>	142
8.32.	ПРОМЫШЛЕННЫЕ МНОГОСТЕННЫЕ УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ ВЫЗЫВАЮТ ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОРГАНАХ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МЫШИ <i>Сычевская К.А., Масютин А.Г., Ерохина М.В., Смирнова Е.А., Онищенко Г.Е.</i>	143
8.33.	ФОРМИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДНК - НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА <i>Толстыко Е.А.</i>	144
8.34.	СВЕТОИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОБЪЕМА САМООРГАНИЗУЮЩИХСЯ СТРУКТУР ДНК - ПАВ <i>Унксов И.Н.</i>	145

СЕКЦИЯ 9

БИОМЕДИЦИНСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1.	ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ Na^+/K^+ -АТФазы ПОЧКИ КРЫСЫ В НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ПРОЛАКТИНА В МОДЕЛИ ХОЛЕСТАЗА БЕРЕМЕННЫХ <i>Абрамичева П.А., Балакина Т.А., Смирнова О.В.</i>	146
9.2.	ПОЛУЧЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО И ЭНДОГЕННОГО С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА СОБАКИ (сCRP) <i>Богомолова А.П.</i>	147
9.3.	ДЕТЕКЦИЯ МУТАЦИЙ ЭКЗОНОВ 12-13 ГЕНА ASXL1 ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ ПРЯМОГО АВТОМАТИЧЕСКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ <i>Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г.</i>	148

9.4.	КОРРЕКТИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ГЕПТАПЕПТИДА БЕТА-КАЗОМОРФИНА-7 (БКМ-7) НА ПАРАМЕТРЫ СОЦИАЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ У КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ ПРЕНАТАЛЬНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ВЫСОКОЙ ДОЗЫ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ <i>Гедзун В.Р., Малышев А.В.</i>	149
9.5.	СИНТЕЗ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЦИТИДИНА С ОБЪЕМНЫМИ АРОМАТИЧЕСКИМИ ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ <i>Гузь А.В., Стрешинец Ф.П., Чистов А.А., Устинов А.В., Коршун В.А.</i> ...	150
9.6.	ПОЛУЧЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ АПКОНВЕРТИРУЮЩИХ НАНОФОСФОРОВ <i>Джунушалиева А.Э., Хайдуков Е.В., Нечаев А.В., Зубов В.П., Звягин А.В., Деев С.М., Генералова А.Н.</i>	151
9.7.	СОЗДАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТОВ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ГИДРОЛАЗ НА ПОЛИСАХАРИДНЫХ НОСИТЕЛЯХ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЕЙ <i>Досадина Э.Э., Белов А.А.</i>	152
9.8.	КОМПОЗИТНЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНОГО КОМПЛЕКСА ХИТОЗАНА С ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ И ГИДРОКСИАПАТИТА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ <i>Дрегваль О.А., Дроздова М.Г., Успенский С.А., Демина Т.С., Акопова Т.А., Зеленецкий А.Н., Марквичева Е.А.</i>	153
9.9.	НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКСА ДОКСОРУБИЦИНА С ДНК КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ <i>Духанина Е.В., Лысенко Ю.А.</i>	154
9.10.	МИКРОНОСИТЕЛИ НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ <i>Злобина М.А., Дроздова М.Г., Фомин А.С., Фадеева И.В., Демина Т.С., Акопова Т.А., Зеленецкий А.Н., Марквичева Е.А.</i>	155
9.11.	ИССЛЕДОВАНИЕ <i>IN VITRO</i> ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛЕНТИВИРУСОВ, НЕСУЩИХ siRNA К ГЕНАМ HIF-1a, HSA8, APEX1, CCND3 В 2D И 3D МОДЕЛЯХ <i>Зубков Д.А., Смирнова Е.В., Бойко А.А., Свиричевская Е.В.</i>	156
9.12.	ДУВУСТОРОННЯЯ ЭЛЕКТРОКОАГУЛЯЦИЯ СРАМНОГО НЕРВА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИСПЫТАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ОТ СТРЕССОВОГО НЕДЕРЖАНИЯ МОЧИ <i>Исмаилова А.М., Туховская Е.А., Мурашев А.Н., Фатхудинов Т.Х.</i> ...	157
9.13.	УЛУЧШЕННАЯ ВАКЦИНА ОТ ГЕМОФИЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ <i>Кривых П.О., Власов П.К.</i>	158
9.14.	ЭФФЕКТЫ ОДНОКРАТНОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ОБЕСТАТИНА И ЕГО ФРАГМЕНТА 1-4 НА ВЕГЕТАТИВНЫЙ БАЛАНС У САМЦОВ КРЫС <i>Курко О.Д., Хиразова Е.Э., Моторыкина Е.С., Маслова М.В., Маклакова А.С., Граф А.В., Замятина Л.А., Андреева Л.А., Соколова Н.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф.</i>	159

9.15.	ПОДАВЛЕНИЕ 4-ГЕКСИЛРЕЗОРЦИНОМ ЭФФЕКТА СТИМУЛЯЦИИ ФОРМИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК НИЗКИМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ АЗИТРОМИЦИНА <i>Мартьянов С.В., Журина М.В., Плакунов В.К.</i>	160
9.16.	ДОЗОЗАВИСИМОСТЬ ЭФФЕКТОВ ФРАГМЕНТА ОБЕСТАТИНА 1-4 У САМОК КРЫС <i>Моторыкина Е.С., Хиразова Е.Э., Маслова М.В., Граф А.В., Маклакова А.С., Курко О.Д., Замятина Л.А., Андреева Л.А., Соколова Н.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф.</i>	161
9.17.	БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ ОТРАВЛЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМ СОЕДИНЕНИЕМ НА МЫШАХ <i>Паликов В.А., Паликова Ю.А., Смирнов И.В., Дьяченко И.А., Мурашев А.Н.</i>	162
9.18.	ИЗУЧЕНИЕ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА РТ1 <i>Паликова Ю.А., Паликов В.А., Андреев Я.А., Дьяченко И.А., Мурашев А.Н.</i>	163
9.19.	ИССЛЕДОВАНИЕ КОНКУРЕНТНЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ КАНДИД И ЛАКТОБАКТЕРИЙ <i>IN VITRO</i> <i>Сачивкина Н.П., Куликов Е.В., Карамян А.С.</i>	164
9.20.	ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛЬГЕТИЧЕСКОГО ПОЛИПЕПТИДА РТ1 ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ CD-1 <i>Скобцова Л.А., Андреев Я.А., Дьяченко И.А., Мурашев А.Н.</i>	165
9.21.	ВЛИЯНИЕ СЕРДЕЧНЫХ ГЛИКОЗИДОВ НА ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ <i>Слободкина Е.А., Куликов А.В., Животовский Б.Д.</i>	166
9.22.	РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОГО НАЗАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ <i>CORYNEBACTERIUM</i> <i>PSEUDODIPHTHERITICUM</i> ШТАММ 090104 <i>Смирнова Я.А.</i>	167
9.23.	РАСПОЗНАВАНИЕ КАПСУЛИРОВАННЫХ БЕЛКОВ Т-КЛЕТКАМИ <i>Щербинина Т.С., Варламов В.П., Свирицевская Е.В.</i>	168
	АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	169
	СОДЕРЖАНИЕ	174