Федеральное агентство научных организаций

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РАН

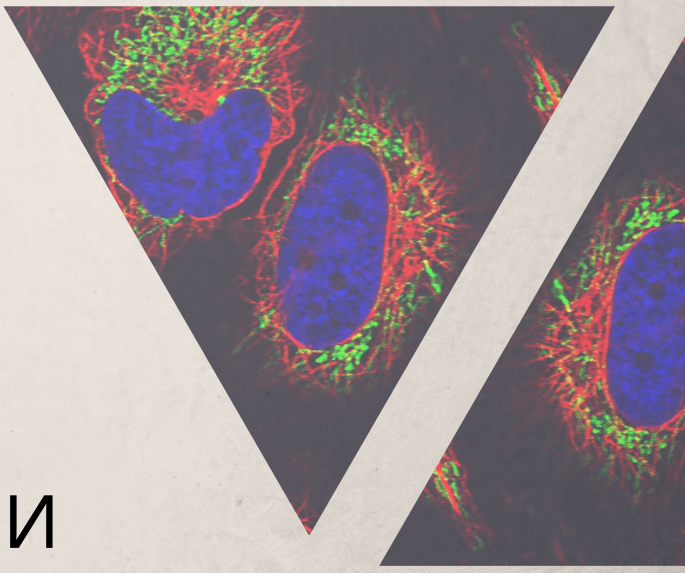
СОВЕТ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН

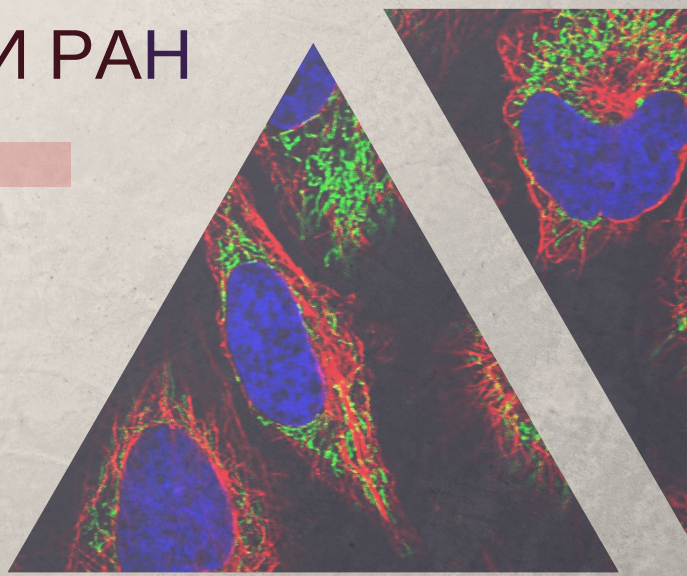
СБОРНИК ТЕЗИСОВ

V МОЛОДЕЖНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН





18 - 21 сентября 2016 г.
Институт цитологии РАН

Санкт-Петербург
2016 г.

Сборник тезисов V молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. СПб, 2016.- 76 с.

В сборник включены тезисы докладов участников V конференции для молодых ученых (18-21 сентября 2016, Санкт-Петербург, Россия). Конференция посвящена активно развивающимся направлениям современной биологии и смежным областям науки:

структура и функции белков
биологические мембраны
молекулярная биология
молекулярная генетика
клеточная биология, физиология клетки
биомедицина и биотехнологии

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии Российской академии наук, 2016

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ПЕРВИЧНЫЕ ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ *IN VITRO.*

© Абдыев В.[1], Дашинимаев Э.Б.[2,3], Воротеляк Е.А.[1,2], Васильев А.В.[1,2].*

[1] Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет МГУ. [2] Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, г.Москва, [3] Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, г.Москва.

vepa_msu@outlook.com

Фундаментальные процессы спецификации и обособления человеческих первичных половых клеток (ППК) в раннем эмбриогенезе очень мало изучены в связи с тем, что, ранние человеческие эмбрионы не доступны для исследований (в виду морально-этических ограничений) и отсутствия корректных клеточных моделей раннего развития ППК in vitro. Исходя из этого, мы поставили перед собой цель исследовать возможность создания подобной клеточной модели, на основе культивируемых плюрипотентных стволовых клеток человека.

В данной работе мы разработали протоколы дифференцировки человеческих эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) в направлении ППК, в условиях как адгезивной клеточной культуры, так и 3D–культивирования в виде эмбриоидных телец (ЭТ). Мы показали, что, в случае дифференцировки на адгезивном субстрате важно учитывать оптимальный размер и рассевание первоначальных клеточных колоний, что увеличивает количество клеток дифференцирующихся в ППК. В случае использования ЭТ также было показано, что увеличение эффективности дифференцировки в ППК связано с уменьшением начального количества клеток, используемого для создания ЭТ. Разработанный протокол дифференцировки включает в себя две ступени: индукция дифференцировки ЭСК и ИПСК до стадии ранней мезодермы, с последующей дифференцировкой при помощи BMP4 в ранние ППК. При помощи проточного цитофлуориметра с функцией сортировки, при помощи окраски на маркер ППК SSEA1 нам удалось получить чистые популяции ППК из гетерогенно дифференцированных смесей. Чистые популяции ППК были жизнеспособны после сортинга и пролиферировали несколько пассажей, во время которых происходило их дальнейшее созревание.

Разработанная нами клеточная модель дифференцировки человеческих плюрипотентных стволовых клеток в первичные половые клетки открывает возможности для изучения процессов формирования ППК на ранних и поздних стадиях спецификации. Одновременно, этот метод позволяет производить моделирование болезней связанные с инфертильностью, таких как, например, при синдроме Дауна.

Работы выполнена в рамках темы государственной программы фундаментальных научных исследований ИБР РАН № 0108-2014-0004.

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРА МЕТАБОЛИЗМА ТХ-14 НА АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК MCF-7.

© Г. Д. Алекбаева, А. Г. Иксанова, М. В. Пугачев, Ю. Г. Штырлин. ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет, Научно-образовательный центр фармацевтики, Казань, Россия

gulnaz.alekbaewa@yandex.ru.

Альтернативой соматической мутационной теории возникновения рака на современном этапе является гипотеза о возникновении заболевания ввиду нарушения митохондриального метаболизма. Основная гипотеза метаболического перепрограммирования опухолевых клеток заключается в постепенном возврате от аэробного гликолиза к окислительному фосфорилированию. В настоящем исследовании проведена оценка биологических эффектов модулятора метаболизма ТХ-14 на митохондрии клеток рака молочной железы человека. В результате

исследований было установлено, что ТХ-14 достоверно увеличивает количество митохондрий в опухолевых клетках MCF-7. Было выявлено, что ТХ-14 на 49 сутки инкубации достоверно снижает внутриклеточный уровень АФК на 25% и увеличивает митохондриальный потенциал в клетках MCF-7 на 170%. Показано, что ТХ-14 ингибирует I комплекс дыхательной цепи с 21 дня инкубации на 67%, активирует II и IV комплексы дыхательной цепи с 7 и 21 дня инкубации в 2 и в 100 раз соответственно, при этом не вызывая достоверных изменений в активности III комплекса дыхательной цепи. Таким образом, ТХ-14 способен вызывать последовательные и устойчивые изменения в опухолевых клетках MCF-7 и представляет интерес при разработке модуляторов метаболизма опухолевых клеток.

ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ У ЭУКАРИОТ С ПОМОЩЬЮ РИБОСОМНОГО ПРОФАЙЛИНГА.

© *Д.Е. Андреев. НИИ Физико-Химической Биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва. cycloheximide@yandex.ru*

С середины прошлого века было известно, что рибосома, транслирующая мРНК, закрывает собой порядка 30 нуклеотидов и защищает их от разрезания рибонуклеазами. Развитие технологий секвенирования следующего поколения привело к разработке метода рибосомного профайлинга, основанного на глубоком секвенировании фрагментов мРНК, защищаемых рибосомой. Рибосомный профайлинг, позволяющий получать информацию о глобальной трансляции всех мРНК в клетке в заданный момент времени, становится универсальным инструментом для изучения экспрессии генов и изменения экспрессии в ответ на активацию различных сигнальных каскадов.

В данном докладе будет показано, как с помощью рибосомного профайлинга можно получать информацию о неканонических событиях белкового синтеза, таких как трансляция в 5’ и 3’ нетранслируемых областях мРНК, сдвиг рамки считывания или декодирование стоп-кодона. Использование рибосомного профайлинга для изучения изменения трансляции при стрессовых воздействиях будет рассмотрено на примерах ответов на окислительный стресс и на удаление кислорода и глюкозы (модель ишемии).

Работа поддержана РНФ (грант № 14-14-00127)

НАКОПЛЕНИЕ БЕТА-АМИЛОИДА В НЕЙРАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ДОНОРОВ С СИНДРОМОМ ДАУНА КАК КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА IN VITRO.

© *А. С. Артюхов,[1,2] Э. Б. Дашинимаев,[2,3] Е. А. Воротеляк,[2,3] А. В. Васильев.[2]*
[1]Московский физико-технический институт. Москва, alexanderartyuhov@gmail.com,
[2]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, [3]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва.

Болезнь Альцгеймера (БА) — наиболее распространенная форма деменции, нейродегенеративное заболевание, связываемое с накоплением бета-амилоидных бляшек и клубков гиперфосфорилированного тау-белка в тканях головного мозга. Как правило, данное заболевание возникает у людей старше 65 лет. В связи с ростом продолжительности жизни в развитых странах к 2050 году количество больных может достигнуть 100 млн человек. Существуют наследственные формы заболевания, развивающиеся в более раннем возрасте. Самой крупной группой риска раннего развития БА являются люди с синдромом Дауна (СД). Синдром Дауна - геномная патология, при которой кариотип содержит 47 хромосом, за счет наличия лишней 21-ой хромосомы. Известно, что до 80% людей с СД к 50 годам приобретают симптомы, значительно схожие с БА, в том числе образование амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков, аналогичных образованиям, возникающим при БА. Также было отмечено, что накопление бета-амилоида у пациентов с СД начинается в раннем

возрасте. Возможно, данная дисфункция процессинга бета-амилоида связана с тем, что гены белка-предшественника амилоида (APP) и бета-секретазы расщепляющей APP (BACE2) находятся на 21-й хромосоме, которая представлена тремя копиями в геноме больных СД.

В данной работе мы поставили перед собой цель изучить возможность создания клеточной модели, воспроизводящей патологические процессы БА на основе клеток доноров с СД. Для этого мы репрограммировали до плюрипотентного состояния три линии клеток амниотической жидкости человека с СД, затем полученные плюрипотентные клетки были дифференцированны в нейральном направлении. Успешность нейральной дифференцировки подтверждена несколькими методами, в том числе с помощью измерения специфической электрофизиологической активности нейронов методом патч-кламп.

В результате мы показали, что нейральные клетки от доноров СД обладают патологическим метаболизмом бета-амилоида по сравнению со здоровым контролем, выражающимся в повышенной секреции и накоплении гранул патологической изоформы бета-амилоида bA-42 в культуре клеток in vitro. Так же в культурах полученных от доноров с СД по сравнению со здоровыми донорами, наблюдается отличия в уровнях экспрессии генов APP, BACE2, TMED10 и RCAN – по литературным данным, эти гены могут участвовать в процессах метаболизма бета-амилоида.

Полученные данные, по нашему мнению говорят о том, что нейральные клетки доноров с СД могут служить адекватной клеточной моделью ранних этапов БА in vitro и могут рассматриваться в качестве основы для создания тест-систем скрининга лекарственных средств против БА.

Работа выполнена в рамках темы государственной программы фундаментальных научных исследований ИБР РАН, №0108-2014-0004.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМОВ.

© *Баттулин Н.Р.* [1,2], *Фишман В.С.* [1,2], *Помазной М.Ю.* [1], *Афонников Д.А.*[1], *Мазур А.М.* [3], *Хабарова А.А.* [1], *Прохорчук Е.Б.* [3], *Серов О.Л*[1,2]

[1] Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, [2] Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, [3] Центр биоинженерии РАН, г. Москва, battulin@gmail.com

Технологии захвата конформации хромосом (chromosome conformation capture, 3C-технологии) позволяют исследовать пространственную организацию ДНК с беспрецедентно высоким разрешением. Используя 3C-методы, было показано, что хромосомы эукариот организованы в компактные пространственные (топологические) домены, которые являются базовой единицей важнейших геномных процессов, таких как транскрипция, репликация и молекулярная эволюция. При этом во всех исследованных типах соматических клеток млекопитающих пространственная архитектура ядерного генома демонстрирует поразительное сходство. Более того, общие принципы пространственной организации наблюдаются при сравнении архитектуры интерфазного ядра клеток млекопитающих, дрозофилы и дрожжей.

Для понимания того, какие механизмы обеспечивают формирование сходной пространственной структуры в разных типах соматических клеток, и даже в клетках разных видов, мы провели исследование пространственной организации ДНК в высокоспециализированном типе клеток млекопитающих – зрелых сперматозоидах мыши.

Исследование зрелых сперматозоидов мыши методом Hi-C показало, что, не смотря на ряд особенностей этих клеток: гаплоидный геном, упаковку ДНК протаминами, отсутствие процесса транскрипции и на порядок меньший размера ядра по сравнению с соматическими клетками, пространственная организация ДНК в сперматозоидах поразительно сходна с пространственной организации геномов соматических клеток. В

частности, в геноме сперматозоидов были выявлены топологические домены и A/B-компартменты, характерные для всех ранее исследованных типов клеток млекопитающих. Для объяснения небольшого числа различий в пространственной укладке геномов соматических клеток и сперматозоидов, мы разработали модель компактизации генома, что позволило объяснить приблизительно четверть выявленных различий.

РЕГИСТРАЦИЯ ПРОХОЖДЕНИЯ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ МОЛЕКУЛ ДНК ЧЕРЕЗ КАНАЛ ЛИПИДНОЙ НАНОТРУБКИ В УСЛОВИЯХ МАЛОЙ ИОННОЙ СИЛЫ.

© *К. В. Чекашкина* [1,2], *П. И. Кузьмин* [2], *Галимзянов Т.Р.*[2], *Г. Е. Позмогова* [1], *Д. В. Клинов* [1], *П.В. Башкиров* [1, 2 1]. ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, [2] ИФХЭ РАН, 119071, Москва
pavel.bashkirov@niifhm.ru

Интерес к нанофлюидике последнее время неуклонно растет, так как ее развитие может оказать значительное влияние на развитие биотехнологии, медицины, клинической диагностики и т.д. Транспорт жидкости через наноскопические каналы/поры, чей поперечный размер составляет менее 100 нм, находится под сильным влиянием поверхностных явлений, возникающих на границе раздела жидкости и стенки канала. Модификация физико-химических свойств поверхности канала позволяет управлять потоком через него жидкости и растворенных в ней веществ. Заполненный электролитом наноканал может использоваться как детектор прохождения отдельных молекул, если размер его люмена сравним с характерным радиусом детектируемых молекул. Однако до сих пор остаются не решенными общие проблемы для большинства наноканалов и нанопор, различной природы – плохо контролируемая геометрия и их нежелательная и неуправляемая блокировка (закупоривание). В тоже самое время в клетках в изобилии присутствуют наноскопические трубчатые структуры образованные липидным бислоем (нанотрубки), которые активно используются для внутри- и межклеточного транспорта макромолекул. Особенность таких структур заключается в том, что липидный бислой сам является двумерной жидкостью, в которой могут возникать явления переноса.

В данном исследовании мы представляем одиночный наноканал с точно регулируемой геометрией и ионной проницаемостью. Наноканалом является просвет мембранной цилиндрической нанотрубки (НТ), вытянутой плоской липидной мембраны (БЛМ). Радиус НТ полностью определяется отношением изгибной жесткоти мембраны к ее латеральному натяжению, в то время как длина НТ регулируется и может быть уменьшена до 50 нм. Изменение изгибной жесткости БЛМ за счет модификации ее липидного состава позволяет варьировать радиус люмена НТ в диапазоне от 4 нм до 12 нм. Такая НТ при добавлении к не специализированного белка динамина представляет собой самоорганизующуюся наноструктуру - мембранный цилиндр, инкапсулированный в белковом каркасе - со строго определенным внутренним радиусом, значение которого, около 1 нм, продиктовано молекулярной геометрией белка. Двумерная текучесть липидного бислоя дает преимущество контролировать плотность поверхностного заряда данных наноканалов. Мы исследуем электрофоретическую миграцию заряженных липидов во внутреннем монослое НТ и связанное с этим изменение концентрации противоионов в просвет НТ. Изменение полярности прикладываемого к концам НТ электрического поля позволяет изменять плотность заряда от ничтожного маленького до чрезвычайно высокого значения 1,7 е/нм^2, и таким образом позволяет регулировать проводимость, ионную селективность и скорость электроосмотического потока наноканала.

Мы обнаружили, что в условиях малой ионной силы поверхностная проводимость становится преобладающей, что позволяет регистрировать прохождение заряженных молекул ДНК через люмен НТ.

МЕХАНИЗМ УБКВИТИН-НЕЗАВИСИМОГО ПРОТЕОЛИЗА ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА ПРОТЕАСОМОЙ И ЕГО СВЯЗЬ С РАЗВИТИЕМ АУТОИММУННОЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ.

© *А. А. Белогуров.* Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, belogurov@mx.ibch.ru.

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 основный белок миелина (MBP), в значительных количествах присутствующий в мембране олигодендроцитов. В процессе метаболизма внутриклеточный протеолиз MBP 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 MBP принадлежит к крайне малочисленной группе белков, способных подвергаться протеолизу 26S протеасомой в отсутствии молекул убиквитина. Молекулярный механизм гидролиза MBP включает в себя заряд-опосредованное связывание с интерферон-индуцибельной субъединицей REGα. Нами было установлено, что при развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (EAE) – животной модели рассеяного склероза – в головном мозге иммунизированных животных конститутивная протеасома в значительной степени замещается иммунопротеасомой, при этом имуносубъединица β1i локализуется преимущественно в олигодендроцитах. Показано, что увеличение содержания иммунопротеасомы в головном мозге мышей с EAE приводит к образованию повышенного количества ряда патогенных пептидов MBP, включая пептид ENPVVHFF, являющийся частью энцефалитогенного региона. Активированные CD8+ Т-клетки, специфичные к данному пептиду, эффективно лизировали олигодендроциты, обработанные интерфероном-гамма. Специфический ингибитор иммуносубъединицы Δ1i селективно воздействовал на иммунопротеасому *in vitro*, а также эффективно подавлял развитие EAE *in vivo* у экспериментальных животных. Полученные факты указывают на 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 была поддержана проектом РНФ № 14-14-00585 "Молекулярны механизм убиквитин-независимого протеолиза белков протеасомой и его роль в норме и патологии".

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА НА АПОПТОЗ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ.

© *Е.Н Бойцева*[1], *Т.И. Кузьмина*[1], *Н.В. Бычкова.*[2] [1]Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург-Пушкин, [2]Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова, Санкт-Петербург, prof.kouzmina@mail.ru

Высокодисперсный кремнезем (ВДК) в низких концентрациях продемонстрировал способность благоприятно воздействовать на подвижность и выживаемость криоконсервированной спермы быков (Чуйко, 2003). Ранее нами получены данные о способности 0,001 % ВДК стимулировать у сперматозоидов капацитацию (Бойцева и др., 2015), одним из пусковых факторов для которой, как известно, является генерация активных форм кислорода (АФК). При избыточном количестве АФК в сперматозоидах происходит индукция апоптоза, который в этих клетках протекает в «урезанной» форме. Цель данного исследования - идентификация характера

воздействия ВДК на апоптоз сперматозоидов быков. Клетки инкубировали с различными концентрациями ВДК в течение 2,5 часов, после чего окрашивали аннексином и пропидиумом йодидом. Обнаружено, что ВДК в концентрациях 0,01 % и 0,001 % достоверно снижает уровень апоптоза в сперматозоидах ($p < 0.07$ и $p < 0.03$, соответственно) и, по-видимому, способствует «смещению» равновесия от апоптоза в сторону капацитации сперматозоидов. С учетом полученных данных и имеющихся в литературе сведений о механизмах триггера капацитации (генерация АФК) можно предположить, что такое воздействие на уровень апоптоза обусловлено способностью ВДК снижать концентрацию АФК в сперматозоидах.

ОРГАНИЗАЦИЯ Х-ХРОМОСОМЫ В ФОЛЛИКУЛЯРНОМ ЭПИТЕЛИИ И ТРОФОЦИТАХ ANOPHELES ATROPARVU И ANOPHELES LABRANCHIAE. С.М.

© *Бондаренко, Г.Н. Артемов.* Томский государственный университет, Томск. semen.bko@ya.ru

Показаны видо- и тканеспецифичные особенности взаиморасположения хромосом у малярийных комаров (Стегний, 1979; Artemov et al., 2015). Цель данной работы обнаружить ткане- и видоспецифичные особенности пространственной организации Х-хромосомы в клетках фолликулярного эпителия (ФЭ) и клетках трофоцитов у близкородственных видов малярийных комаров *An. atroparvus* и *An. labranchiae*.

Положение Х-хромосомы определяли с помощью 3D-FISH ДНК-пробы микродиссектированной Х-хромосомы с интактными ядрами клеток яичников *An. atroparvus* и *An. labranchiae*. Микроскопический анализ проводили с использованием конфокального микроскопа LSM 780 (“Carl Zeiss”, Германия), и обрабатывали в «TANGO» (Ollion, 2013).
Относительный объем Х-хромосомы значимо больше в клетках трофоцитов (8-11%), чем в клетках ФЭ (4-5%). Х-хромосома не увеличивается с ростом ядра только у *An. atroparvus*. В процессе роста трофоцита угол наклона Х-хромосомы относительно ядерной оболочки уменьшается, тогда как в ФЭ наблюдается обратная тенденция. Удалось установить, что, перемещаясь, Х-хромосома трофоцитов «тянет» за собой ядрышко, изменяя его форму. Таким образом, продемонстрировано, что динамика роста и положения ядрышка связана с пространственным расположением Х-хромосомы у близких видов малярийных комаров.

ВЛИЯНИЕ ЛЕЧЕНИЯ МЕТФОРМИНОМ КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА НА АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТ-ЦИКЛАЗЫ В ГИПОТАЛАМУСЕ.

© *Д.М. Бузанаков, А.А. Куликова, К.В. Деркач, А.О. Шпаков.* Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, dmitrybuzanakov@gmail.com

Метформин (МФ) является одним из основных препаратов для лечения сахарного диабета 2-го типа (СД2). В основе его действия лежит регуляция АМФ-зависимой протеинкиназы, которая функционально связана с аденилатциклазой (АЦ). Однако в настоящее время влияние МФ на АЦ остается мало изученным. Цель работы – изучить влияние длительной терапии МФ самцов крыс с неонатальной моделью СД2 на активность гипоталамической аденилатциклазной системы, чувствительной к моноаминам и пептидным гормонам. Неонатальную модель СД2 вызывали обработкой 5-тисуточных крысят стрептозотоцином (75 мг/кг). Исследовали 3 группы крыс – диабетических животных (Д, n=6), диабетических животных, получавших в течение 2 месяцев МФ (200 мг/кг/день, Д+МФ, n=6), и контроль (К, n=6). Активность АЦ определяли во фракциях плазматических мембран гипоталамуса крыс с помощью радиоизотопного метода и выражали в пмоль цАМФ/мин на мг белка. В плазматических мембранах, выделенных из гипоталамуса крыс группы Д, были снижены стимулирующие АЦ эффекты агонистов меланокортиновых рецепторов 3-го и 4-го типов и серотонина, а также ослаблены ингибирующие АЦ эффекты D_2-агониста бромокриптина и агониста серотониновых рецепторов 1В подтипа 5-нонилокситриптамина. В группе Д+МФ

восстанавливались стимулирующие АЦ эффекты агонистов меланокортиновых рецепторов и ингибирующий эффект бромокриптина. Таким образом, восстанавливающий эффект МФ на регуляцию АЦ агонистами меланокортиновых и D_2-дофаминовых рецепторов в гипоталамусе крыс с СД2 может рассматриваться, как один из молекулярных механизмов его антидиабетического действия.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (проект 14-15-00413).

РОЛЬ P53 В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ТРАНСАКТИВАТОРА YAP.

© *Е.А Васильева,*[1] *О. А. Федорова,*[1] *А. А. Дакс,*[1] *О. Ю. Шувалов,*[1] *А. В. Петухов,*[1] *Т.А. Лялина,*[1] *Н.А. Барлев.*[1] [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
slkd-k@mail.ru

В основе Hippo сигнального пути опухолевой супрессии лежит негативная регуляция Yes-ассоциированного белка YAP и транскрипционного регулятора TAZ. Этот сигнальный путь играет важнейшую роль в процессах пролиферации клеток, дифференцировке и клеточной смерти. Несмотря на то, что роль основных участников Hippo пути MST1/2, Salvador, LATS1/2 и MOB1 была показана в опухолевой супрессии, транскрипционные активаторы YAP/TAZ преимущественно имеют онкогенную роль. Было показано, что гиперактивация YAP способствует развитию рака. Более того, Hippo сигнальный путь вовлечен в ряд не связанных с раком заболеваний и играет важную роль в процессах регенерации тканей (Gomez, Gomez, & Hergovich, 2014).

Белок p53 является транскрипционным фактором, мутированным в половине случаев раков. В нормальных клетках p53 участвует в регуляции клеточного цикла, апоптоза и репарации ДНК в ответ на различного рода генотоксический стресс (Chuikov et al., 2004). Нами было показано, что p53 участвует в регуляции экспрессии транскрипционного активатора YAP. Исследование уровня экспрессии белка YAP в клеточных линиях HCT116 p53+ и HCT116 p53- позволило обнаружить, что p53 влияет на изменение экспрессии как на уровне мРНК, так и на уровне белка.

Список литературы:

Chuikov, S., Kurash, J. K., Wilson, J. R., Xiao, B., Justin, N., Ivanov, G. S., Reinberg, D. (2004). Regulation of p53 activity through lysine methylation, *432*

Gomez, M., Gomez, V., & Hergovich, A. (2014). The Hippo pathway in disease and therapy: cancer and beyond. *Clinical and Translational Medicine*, *3*(1), 22.

ЗАЧЕМ МЫ ИЗУЧАЕМ ЯДЫ ЖИВОТНЫХ.

© *А. А. Василевский*. Институт биоорганической химии РАН, Москва, avas@ibch.ru

Ядовитость – один из важнейших факторов в эволюции животных. Интерес исследователей к ядам продиктован тремя главными аспектами. Во-первых, понимание механизма действия ядов дает основу для создания противоядий. Во-вторых, биотоксины оказались незаменимыми инструментами исследований их мишеней и соответствующих физиологических процессов. В-третьих, природные яды рассматривают как богатейшие фармакопеи, а их компоненты – как прототипы лекарственных средств. Наиболее изученными ядовитыми организмами являются те, что имеют медицинское и/или экономическое значение для развитых стран. При этом яды многих хорошо известных животных не изучались вовсе, хотя обладают не меньшим потенциалом. В докладе я постараюсь рассказать о наших последних результатах: структуре и функции уникальных токсинов, выработке рекомендаций для лечения укусов тропических пауков, создании нового класса молекулярных инструментов для изучения ионных каналов, возможном подходе к лечению гипокалиемического периодического паралича.

Работа поддержана грантом РНФ № 14-14-01180.

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ, СОДЕРЖАЩИХ ТИМУЛИН, ПРИ ОСТРОМ ВОСПАЛЕНИИ У МЫШЕЙ.

© *Е.В. Виноградова,[1,2] В.В. Спиридонкова,[3] Н.В. Лесовая,[3] А. Ю. Колодина,[3] М.О. Хренов,[1] С.М. Лунин,[1] О.В. Глушкова[1]*.
[1]Институт биофизики клетки РАН, Пущино, [2]Пущинский государственный естественнонаучный институт, Пущино, [3]Технологический факультет Воронежского государственного университета инженерных технологий, Воронеж
elenakinskey@yandex.ru

За последнее десятилетие появилось множество работ, посвященных исследованию воспалительных процессов. Самая тяжелая и плохо поддающаяся лечению форма септических воспалений вызывается токсинами грамотрицательных бактерий. На сегодняшний день известно, что сенсором грамотрицательных бактерий является рецептор TLR4, способный активировать множество нисходящих киназ и транскрипционных факторов, запускающих эффекторные ответы как в виде воспалительных, так и противовоспалительных реакций. Ранее нами было показано, что профилактическое применение пептидного гормона тимусного происхождения тимулина способно ослабить провоспалительные ответы организма мышей при остром септическом воспалении, вызванном ЛПС. Тем не менее, защитное действие тимулина ограничено, так как пептид является короткоживущим и разлагается в плазме крови млекопитающих в течение 10-15 минут. Поэтому нами были исследованы возможности увеличения времени существования тимулина в крови путем его связывания с полимерными (полибутилцианоакрилат) наночастицами.
Целью настоящей работы явилось исследование возможности защитного эффекта наночастиц, содержащих тимулин, при развитии острого воспаления септической природы у мышей, вызванного липополисахаридом из клеточных стенок грамотрицательных бактерий. Для этого оценили активацию сигнальных путей NF-κB и SAPK/JNK, продукцию белков теплового шока HSP72, HSP90 в иммунных клетках, про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови мышей.
Было обнаружено, что профилактическое применение наночастиц с тимулином приводило к достоверному ослаблению активации сигнального пути NF-κB и содержания белков теплового шока HSP72 и HSP90 в спленоцитах мышей с септическим воспалением. В то время как септическое воспаление вызывало существенное повышение уровня провоспалительных цитокинов TNF-α, IFN-γ, IL-1, Il-6 в сыворотке крови мышей, предварительное введение животным наночастиц, содержащих тимулин, приводило к нормализации цитокинового профиля. Интересно, что защитное действие наночастиц с тимулином превышало противовоспалительный эффект, оказываемый тимулином.
Таким образом, наночастицы, содержащие тимулин, обладают выраженным противовоспалительным действием при профилактике септических воспалений, вызванных грамотрицательными бактериями.
Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 16-34-00231, 16-04-00268).

УЧАСТИЕ КОАКТИВАТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В ЭКДИЗОН-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

© *Воробьева Н.Е., Мазина М.Ю., Деревянко П.А., Кочерыжкина Е.В., Николенко Ю.В., Краснов А.Н.*. Группа по изучению связи транскрипции и транспорта мРНК, Институт биологии гена РАН, Москва, nvorobyova@gmail.com

Транскрипция генов эукариот представляет собой сложный процесс, который происходит при участии десятков мультисубъединичных белковых комплексов. Коактиваторные комплексы не способны специфически связывать регуляторные участки генов и, поэтому, их вовлечение в процесс транскрипции происходит за счет взаимодействия с ДНК-связываюшими транскрипционными активаторами. Так как коактиваторные комплексы способны взаимодействовать с множеством различных ДНК-связывающих белков, то они участвуют в транскрипции многих генов организма. Долгое

время считалось, что инициация транскрипции является ведущим ее этапом, на котором осуществляется регуляция данного процесса. Недавно было обнаружено, что многие коактиваторные комплексы способны осуществлять регуляцию (активацию/репрессию) транскрипции за счет воздействия на другие этапы процесса. Для большинства известных коактивторных комплексов до сих пор остается не охарактеризованной их роль в различных этапах транскрипционного процесса, таких как элонгация, терминация, формирование мРНП частицы. Основная задача нашего исследования является описание взаимосвязей в функционировании различных коактиваторных комплексов и их роли в процессе активации транскрипции генов.

В ходе работы нами была охарактеризована новая модельная система, позволяющая индуцировать транскрипцию *DHR3* и *Hr4* генов развития дрозофилы в культивируемой культуре клеток эмбрионального происхождения. При помощи серии экспериментов мы показали, что данные гены являются удобной системой, позволяющей исследовать процесс активации транскрипции генов под воздействием 20-гидроксиэкдизона. Мы в деталях охарактеризовали ранние этапы активации транскрипции генов *DHR3* и *Hr4*. Изучение кинетики привлечения общих факторов транскрипции и различных модификаций большой субъединицы РНК полимеразы II позволило нам выделить несколько отдельных стадий процесса активации транскрипции. Воздействие 20-гидроксиэкдизона на *DHR3* и *Hr4* гены приводило к отдельным актам стимуляции инициации и элонгации транскрипции данных генов. В результате дальнейшей работы нами была получена детальная кинетика привлечения 20 различных коактиваторных комплексов на промоторы индуцируемых генов. Полученные данные позволили нам предложить молекулярную модель, описывающую процесс активации транскрипции экдизон-зависимых генов, а также роль различных коактиваторных комплексов в отдельных ее этапах.

Данная работа была поддержана грантом Российского научного фонда №14-14-01032.

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРА МЕТАБОЛИЗМА НА ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛЬ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА.

© *Р. Р. Габбасова, А. Г. Иксанова, М. Н. Агафонова, М. В. Пугачев, Ю. Г. Штырлин.* ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Научно-образовательный центр фармацевтики, Казань, raylya.gabbasova@mail.ru

При разработке метаболических модуляторов опухолевых клеток основное внимание исследователей направлено на разработку супрессоров тех или иных биосинтетических или биоэнергетических процессов.

Целью данного исследования является изучение динамики изменений протеомного профиля опухолевых клеток MCF-7 в процессе инкубации с гетероциклическим соединением ТХ-14. Внутриклеточные изменения оценивали с помощью протеомного анализа с привлечением двумерного электрофореза и масс-спектрометрии.

В ходе исследований было показано, что большая часть белков отличия, как приобретенных, так и потерянных, обладают каталитической, связывающей, транскрипторной и структурирующей активностями.

Особое внимание следует уделить митохондриальным изменениям в клетке. Было установлено, что в клетках MCF-7/ТХ-14 начинают гиперэкспрессироваться субъединицы белковых комплексов митохондриальной цепи – субъединица 1 альфа подкомплекса 1 НАДН-дегидрогеназы [убихинон] NDUA2, митохондриальный фактор сборки сукцинатдегидрогеназы 1 SDHF1.

Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что гетероциклическое соединение ТХ-14 является эффективным модулятором метаболизма опухолевых клеток и представляет интерес в качестве объекта исследований при разработке противоопухолевых препаратов.

ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА НА СВОЙСТВА АКТИНА В РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ СОСТОЯНИЯХ.

© *Ю.А Гагарская,*[1,2] *О.И. Поварова,*[1] *И.М Кузнецова,*[1] *К.К. Туроверов.*[1,2] [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, julgag@yandex.ru, [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург.

Известны две формы существования актина в клетке: глобулярный или G-актин и фибриллярный или F-актин. G-актин в нативном состоянии обладает кинетически стабильной, но термодинамически нестабильной структурой, которая в отсутствии Ca^{2+} или других бивалентных ионов металлов *in vitro* спонтанно превращается в термодинамически стабильную форму – инактивированный актин (I-актин).

Существует предположение, что молекулярный краудинг играет важную роль в поддержании нативной структуры G-актина и формировании филаментов актина. В данной работе было показано, что в широком диапазоне концентраций декстран 70 не влияет на структуру G-актина, в то время как увеличение концентрации ПЭГ 8000 приводит к увеличению параметров собственной флуоресценции белка, что может свидетельствовать об образовании F-актина. Показано, что присутствие краудинг агентов замедляет процесс денатурации актина под действием химических денатурантов, но не предотвращает его. Флуоресцентные характеристики I-актина, полученного в разбавленных растворах и в условиях молекулярного краудинга, не различаются между собой.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект № 14-24-00131).

ЭКСПРЕССИЯ мРНК ГЕНОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО МИЕЛИНА В ТРАВМИРОВАННОМ СПИННОМ МОЗГЕ КРЫС.

© *Л.Р. Галиева, Е.Е. Гаранина, Э.Р. Санатова, Я.О. Мухамедшина.* ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань
loisa_@mail.ru

Компенсация демиелинизации является одним из актуальных направлений для преодоления последствий травмы спинного мозга. Экспериментально подтверждено, что после повреждения спинного мозга шванновские клетки (ШК) мигрируют из периферической нервной системы (ПНС) к месту травмы и участвуют в ремиелинизации аксонов, тем самым способствуя регенерации. Миелин ШК является функциональным, поскольку он восстанавливает проводимость аксонов. Примечательно, что формирующие заместительный периферический миелин ШК постепенно замещаются олигодендроцитами. Белковые продукты генов *mpz, pmp2* и *pmp22* являются миелин-ассоциированными белками ПНС. В частности, белок PMP2 является липидным транспортным белком ШК, а так же участвует в процессах миелинизации в ПНС. Белок PMP22 регулирует пролиферацию ШК, белок P0 (продукт гена *mpz*) выполняет стабилизирующую функцию слоев миелина относительно друг друга. Для количественной оценки экспрессии генов *mpz, pmp2, pmp22* использовали мРНК, выделенную из интактного спинного мозга, интактного периферического нерва, а так же из ткани травмированного спинного мозга крыс на 30 сутки после повреждения. Было показано, что контузионная травма спинного мозга крысы приводит к уменьшению экспрессии генов *pmp2, pmp22*, и увеличению экспрессии гена *mpz*.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №16-34-60101_мол_а_дк и Президента РФ (МК-4020.2015.7).

МУЖСКАЯ СТЕРИЛЬНОСТЬ МУТАНТОВ ПО ГЕНУ *NXF1* (NUCLEAR EXPORT FACTOR 1) *DROSOPHILA MELANOGASTER*: СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЯДЕРНОГО ЭКСПОРТА МРНК В СПЕРМАТОГЕНЕЗЕ.

© *В. Р. Гинанова, Е. В. Голубкова, Л. А. Мамон.* Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, v.ginanova@gmail.com

Ген *nxf1* кодирует основной экспортёр всех мРНК из ядра в цитоплазму у эукариот группы Opisthokonta (грибы и животные). Этот эволюционно-консервативный белок необходим всем клеткам с активной транскрипцией, поэтому в большинстве случаев мутации в гене *nxf1* летальны. Однако в одном из случаев у *D. melanogaster* мутация в этом гене на фоне нормального аллеля вызывает доминантную мужскую стерильность, не приводя к нарушениям у самок. Мы определили молекулярную природу мутантного аллеля, исследовали изменения экспрессии гена *nxf1* у самцов-носителей мутации и показали наличие мутантного белка, а также проанализировали альтернативные транскрипты, характерные для *nxf1* в семенниках дрозофилы, выявив альтернативный промотор и сайты альтернативного полиаделинирования, использующиеся исключительно в тканях семенников. В данном исследовании мы освещаем особенности экспрессии генов в таком специализированном процессе, как сперматогенез, и обсуждаем, как изменения в основном факторе экспорта мРНК могут приводить к стерильности. Важно отметить, что ортологичный ген вызывает нарушения сперматогенеза у мышей, а у человека один из генов семейства *nxf является геном-кандидатом, вызывающим* олигозооспермию (снижение количества сперматозоидов в сперме), поэтому, по-видимому, гены этого семейства необходимы для реализации мужской репродуктивной функции.

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА НЕСТИМУЛИРОВАННЫЕ ЛИМФОЦИТЫ ПРИ ТКАНЕВОМ УРОВНЕ КИСЛОРОДА.

© *А.Н. Горностаева, П.И. Бобылева, Л.Б. Буравкова.* ГНЦ РФ – ИМБП РАН, Москва, HindIII@yandex.ru

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) обладают иммуномодуляторными свойствами. Иммуносупрессивные эффекты МСК обычно изучают при взаимодействии с активированными лимфоцитами. Влияние их на неактивированные лимфоциты описано не так подробно, хотя их ответ также имеет большое значение. Все имеющиеся данные получены при стандартной концентрации кислорода (20%). Однако, содержание кислорода в тканях организма и естественной нише МСК гораздо ниже (1-7%).

Мы впервые оценили влияние МСК из жировой ткани человека на нестимулированные лимфоциты при атмосферном (20%) и близком к тканевому (5% O_2) уровне O_2 при контактном и паракринном взаимодействии.

Как при 5%, так и при 20% O_2 МСК не провоцировали позднюю активацию лимфоцитов (маркеры CD25 и HLA-DR) и пролиферативный ответ, не влияли на активность митохондрий. Однако, ранняя активация (маркер CD69) после взаимодействия увеличивалась. В гипоксии и при отсутствии клеточных контактов этот эффект ослаблялся. После сокультивирования существенно снижался уровень активных форм кислорода, при прямом взаимодействии МСК поддерживали жизнеспособность лимфоцитов. Таким образом, в гипоксии эффекты МСК сохраняются и могут модифицироваться, а для более полного их проявления необходим прямой клеточный контакт.

Работа выполнена при поддержке Стипендии Президента РФ СП-3502.2015.4

МОДУЛЯЦИЯ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОГО СТАРЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ mTORC1 И ERK СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ.

© *А.А. Грюкова, А.В. Бородкина, А.Н. Шатрова, П.И. Дерябин, Е.Б. Бурова*. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, grukova77@mail.ru

Ранее мы показали, что в ответ на сублетальный окислительный стресс в эндометриальных стволовых клетках человека (эМСК) активируются p53/p21/Rb, mTORC1 и MAPK сигнальные пути, участвующие в прогрессии преждевременного старения. В данной работе мы оценили возможность предотвращения H_2O_2-индуцированного

старения эМСК при использовании специфических ингибиторов mTORC1 (рапамицин) и ERK (U0126). Как рапамицин, так и U0126 частично отменяли развитие фенотипа стареющих клеток, но не арест клеточного цикла. Эти данные согласуются с тем, что подавление активности и mTORC1, и ERK не ингибировало основные сигнальные пути, опосредующие блок клеточного цикла H_2O_2-обработанных эМСК – p53/p21/Rb и p38MAPK/MAPKAPK/Rb. Примечательно, что mTORC1 и ERK сигнальные каскады оказались взаимосвязанными: ингибирование mTORC1 усиливало активацию Raf1/MEK/ERK/p90RSK пути, тогда как супрессия активности ERK не вызывала изменения функционального статуса мишеней mTORC1, включая p70S6K, S6 и 4E-BP1. Эти результаты свидетельствуют о том, что mTORC1 является негативным регулятором ERK каскада. Таким образом, ингибирование mTORC1 и ERK способствует частичному предотвращению фенотипа старения H_2O_2-стимулированных эМСК, однако не приводит к восстановлению их пролиферации.

РНК-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК HUR – НОВАЯ МИШЕНЬ УБИКВИТИНЛИГАЗЫ PIRH2.

© *А.А. Дакс, О.А. Федорова, В.О. Меркулов, А.В. Петухов, О.Ю. Шувалов, Е.А. Васильева и Н.А. Барлев*. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
alexandra.daks@gmail.com

Белок Pirh2 является убиквитинлигазой, модифицирующей белки семейства p53 (p53, p63 и p73), а также такие белки, как PolH, $p27^{Kip1}$, c-Myc и Chk2. Негативная регуляция белков семейства p53, а также повышенная экспрессия Pirh2 в таких типах опухолей, как, например, рак легкого, гепатоклеточная карцинома и рак предстательной железы, а также корреляция высокого уровня Pirh2 в опухолевых клетках с неблагоприятным прогнозом и снижением уровня выживаемости пациентов, свидетельствуют в пользу онкогенной роли данного белка. Для того чтобы приблизиться к пониманию Pirh2-опосредованной регуляции клеточных процессов ранее мы осуществили анализ интерактома данной убиквитинлигазы и выявили более 100 новых партнеров Pirh2 по межбелковым взаимодействиям.
Среди прочих интерактантов мы идентифицировали РНК-связывающий белок HuR. Связываясь с 3'UTR целевых мРНК, HuR влияет на их стабильность. Показано, что белок HuR регулирует экспрессию многих важных факторов, таких как c-Myc, циклины A, B1, D1 и E, p53, TNF-alpha. Мы подтвердили физическое взаимодействие Pirh2 и HuR с помощью GST-пулдауна и коиммунопреципитации. Мы также показали, что Pirh2 убиквитинирует HuR и способствует его деградации. Мы предполагаем, что онкогенная роль Pirh2 по крайней мере частично объясняется этим новым механизмом негативной регуляции белка HuR.

Работа поддержана грантами РФФИ 16-34-00869 мол_а и 16-34-60228 мол_а_дк.

ОБНАРУЖЕНИЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ГЕТЕРОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ СМЕСЯХ ПРИ ПОМОЩИ ЦИФРОВОГО ПЦР.

© *Дашинимаев Э.Б.*[1,2], *Артюхов А.С.*[2,3], *Воротеляк Е.А.*[1,2], *Васильев А.В.*[1] [1]Институт биологии развития им.Н.К.Кольцова РАН, [2] Российский национальный исследовательский медицинский университет им.Н.И.Пирогова, [3] Московский физико-технический институт (государственный университет), г.Москва. dashinimaev@gmail.com

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) являются перспективным источником биоматериала для нужд регенеративной медицины. Однако сами ИПСК, попав в организм с иммунной совместимостью, могут дать начало злокачественным новообразованиям. Поэтому необходимо определять остаточное содержание ИПСК в биомедицинских клеточных продуктах, которые будут предназначены для трансплантаций. В данной работе мы провели модельный эксперимент по поиску ИПСК в гетерогенных клеточных смесях, при помощи трех разных способов: проточной цитофлуориметрии, ОТ-ПЦР в реальном времени и цифрового капельного ОТ-ПЦР. В результате мы показали практическую возможность поиска ИПСК в

гетерогенных клеточных смесях, нами были подобраны условия проведения тестов, определены чувствительности разных способов. Для метода проточной цитофлуориметрии чувствительность составила 1%, для ОТ-ПЦР в реальном времени - 0,017% и для цифрового капельного ОТ - 0,002%. Также нами были сформированы рекомендации для дальнейшей валидации предложенных методов.

Работа выполнена в рамках темы государственной программы фундаментальных научных исследований ИБР РАН,№0108-2014-0004.

ЭЛИМИНАЦИЯ И ЭНДОРЕПЛИКАЦИЯ ГЕНОМОВ В ГАМЕТОГЕНЕЗЕ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ИЗ КОМПЛЕКСА ЗЕЛЕНЫХ ЛЯГУШЕК *PELOPHYLAX ESCULENTUS.*

© *Д.В. Дедух*[1], *Д.А. Шабанов*[2], *Ю.М. Розанов*[3], *С.Н. Литвинчук*[3], *А.В. Красикова*[1]. [1]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия, dmitrijdedukh@gmail.com;
[2]Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, Харьков, Украина; [3]Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.

Преодоление постгибридизационных барьеров у межвидовых гибридов возможно благодаря изменениям гаметогенеза, которые позволяют избежать конфликта хромосом разных родительских видов в мейозе. Такие изменения гаметогенеза обычно включают эндоредупликацию родительских геномов в клетках зародышевой линии гибрида, а также избирательную элиминацию одного из родительских геномов. Удобной моделью для изучения механизмов и роли элиминации и эндоредупликации геномов в гаметогенезе межвидовых гибридов животных представляется комплекс среднеевропейских зеленых лягушек. Этот комплекс включает два родительских вида – озерную лягушку *P. ridibundus* (геномная композиция RR, 2n=26) и прудовую лягушку *P. lessonae* (геномная композиция LL, 2n=26), а также гибридную форму – съедобную лягушку (*P. esculentus*), которая представлена диплоидными (RL, 2n=26) и двумя формами триплоидных гибридов (RRL и LLR, 3n=39). Для того чтобы охарактеризовать процессы элиминации и эндорепликации геномов в ходе гаметогенеза гибридных лягушек, мы охарактеризовали наборы хромосом, передаваемые в ооцитах ди- и триплоидных самок *P. esculentus,* а также проанализировали кариотипы головастиков, полученных в результате искусственных скрещиваний гибридных лягушек. Мы обнаружили, что в гаметогенезе большинства ди- и триплоидных гибридных самок происходит премейотическое удаление генома *P. lessonae,* в результате чего геном *P. ridibundus* передается в гаметы. В гаметогенезе диплоидных гибридов после элиминации генома *P. lessonae* также происходит раунд эндорепликации генома *P. ridibundus*. Нарушения элиминации и эндорепликации геномов в гаметогенезе диплоидных гибридных самок могут приводить к диплоидным гаметам, которые необходимы для появления триплоидных гибридов. Мы установили, что триплоидные гибриды не способны самостоятельно воспроизводиться в популяционных системах, так как они производят преимущественно гаплоидные гаметы.

Чтобы обнаружить способ элиминации одного из родительских геномов в раннем гаметогенезе гибридных животных, мы проанализировали гонады головастиков, полученных в результате скрещиваний. В цитоплазме зародышевых клеток гибридных головастиков мы обнаружили хроматин-позитивные тельца (микроядра), которые вероятно содержат элиминируемый геном. Элиминируемый геном, предположительно геном *P. lessonae,* характеризуются накоплением маркеров гетерохроматина. Процессы элиминации и эндорепликации геномов, происходящие в гаметогенезе гибридных лягушек, обеспечивают формирование фертильных гамет с различной плоидностью и геномной композицией, что необходимо для возникновения и воспроизводства ди- и триплоидных гибридных животных в изучаемых популяционных системах.

Работа поддержана грантом РФФИ мол_а_вед № 15-34-21020. Работа выполнена с использованием оборудования ресурсных

центров СПбГУ «Хромас», «Обсерватория экологической безопасности» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.

© *П.И.Дерябин, А.В.Бородкина, А.Н.Шатрова, А.А.Грюкова, Е.Б.Бурова.* Институт цитологии РАН (ИНЦ РАН), Санкт-Петербург, pavel_deryabin@list.ru .

Надежно установлено, что внутриклеточный кальций ($[Ca^{2+}]_i$) играет важную роль в индукции апоптоза и некроза, однако данные о его участии в развитии старения немногочисленны. Ранее мы показали, что мезенхимальные эндометриальные стволовые клетки человека (эМСК) в условиях сублетального окислительного стресса входят в состояние преждевременного старения. В настоящей работе мы исследовали возможную роль $[Ca^{2+}]_i$ в прогрессии H_2O_2-индуцированного старения эМСК. Оказалось, что сублетальный окислительный стресс (200μM H_2O_2) сопровождается быстрой мобилизацией $[Ca^{2+}]_i$, причем повышение уровня $[Ca^{2+}]_i$ происходит главным образом за счет внутриклеточных источников. Для выяснения вклада увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в старение эМСК применили специфический хелатор кальция BAPTA-AM. Предобработка клеток 10 μM BAPTA-AM эффективно снижала уровень $[Ca^{2+}]_i$ в стареющих клетках. Хелатирование $[Ca^{2+}]_i$ предотвращало развитие фенотипа старения, отменяло p53/p21-опосредованный блок клеточного цикла и способствовало поддержанию пролиферации H_2O_2-стимулированных клеток. Кроме того, обработка клеток BAPTA-AM в условиях окислительного стресса приводила к кратковременной активации аутофагии, о чем свидетельствует активация AMPK/mTOR/ULK1 сигналинга и липидизация LC3. Суммируя, хелатирование внутриклеточного $[Ca^{2+}]_i$ предотвращает преждевременное старение H2O2-обработанных эМСК и запускает аутофагию.

ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© *Е.В. Добровольская[1], Е.Н. Прошкина[1,2], И.А. Соловьев [1,2], А.А. Москалев[1,2]*
[1]*ФГБУН Институт биологии Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар), Россия,* dobrovolskaya.evgenia@gmail.com,
[2]ФГБОУ ВПО Сыктывкарский государственный университет (Сыктывкар), Россия.

Процесс старения ассоциирован с нарушением суточных ритмов. К факторам, формирующим биологические часы, относятся режим осветления и питания. Среди причин, ведущих к преждевременному старению, можно выделить нарушение режима питания (Partridge, 2002) и изменение экспрессии генов циркадных ритмов (Kondratov, 2008). Ранее было показано, что ограничительная диета увеличивает амплитуду экспрессии генов циркадных ритмов, как у мышей, так и дрозофил, которое приводит к увеличению продолжительности жизни (Katewa, 2015). Используя метод qRT PCR мы наблюдали, что у дрозофил с возрастом снижается экспрессия генов циркадных ритмов. Поэтому мы предположили, что компенсация активности генов циркадных ритмов *(cryptochrome, period, clock, cycle, timeless)* может положительно сказаться на продолжительности жизни и показателях качества жизни (стрессоустойчивости и возрастной динамики суточной активности) особей *Drosophila melanogaster*, а калорийность диеты окажет на них модифицирующее действие. Для этого производили кондиционную (мифепристон-индуцибельную) активацию экспрессии исследуемых генов с помощью *UAS/GAL4* системы в нервной, мышечной системах и жировом теле мух. Мух с заданными генотипами помещали на питательную среду с разным уровнем калорийности, после чего оценивали перечисленные показатели. Предварительный анализ уровня экспрессии генов циркадных ритмов потомков экспериментального скрещивания при действии мифепристона показал статистически значимое увеличение активности всех исследуемых генов на 10 – 3700 % ($p<0.05$ критерий Манна-Уитни). Сверхэкспрессия

генов *cryptochrome* и *cycle* в нервной системе самцов увеличила медианную продолжительность жизни на 15 % ($p<0.01$, критерий Гехана-Вилкоксона) и 10.7 % ($p<0.001$), соответственно, а у самок сверхэкспрессия генов *cryptochrome, clock, period* в нервной системе повысила медианную продолжительность жизни на 8.7 % ($p<0.01$), 3.4 % ($p<0.01$) и 9.4 % ($p<0.001$). Сверхэкспрессия генов *cryptochrome* и *cycle* в нервной системе у самцов увеличила стрессоустойчивость к гипертермии, действию прооксиданта и голодания. Сверхактивация всех исследуемых генов циркадных ритмов в мышечной системе у самцов при изучении влияния разной калорийности питания на обеих средах вызвала снижение медианной продолжительности жизни на 5.1 – 61% ($p<0.01$). У самок сверхэкспрессия генов *timeless* и *period* в мышцах на низкокалорийной среде вызвала увеличение медианной продолжительности жизни на 5.5 % ($p<0.01$) и 4.7 % ($p<0.01$), соответственно. Сверхэкспрессия гена *cycle* в жировом теле увеличивает медианную продолжительность жизни на обычной среде на 23.7 % ($p<0.001$), на низкокалорийной – на 8.7 % ($p<0.001$). Таким образом, обнаружено влияние сверхэкспрессии генов регуляции циркадных ритмов на продолжительность жизни и скорость старения дрозофил, выраженность которого зависела от индуцированного гена и уровня его сверхэкспрессии, калорийности диеты, типа ткани и пола.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00734 и грантом Президиума УрО РАН N15-4-4-23.

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ В НАЗЕМНЫХ УСЛОВИЯХ ЭФФЕКТОВ МИКРО-ГРАВИТАЦИИ.

М.О. Досина, Д.П.Токальчик, Ж.А. Гладкова. Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Pochta_margo@mail.ru

Известно, что в условиях микрогравитации изменяется пролиферативная активность клеток растений. Цель работы – экспериментальное обоснование выбора растений, способных адаптироваться к условиям микрогравитации. Одним из признаков такой адаптивности является пролиферативная активность клеток растений. Объектом исследования являлись семена растений кресс-салата, гороха и риса. Для сопоставления пролиферативной активности клеток растений использовали 3 серии экспериментов: 1 – чашка Петри с семенами растений располагалась все время вертикально (естественное действие гравитации), 2 – через 24 часа осуществляли поворот чашки Петри с семенами на ∠90° по часовой стрелке на 4 часа (модель естественного действия гравитации после поворота на ∠90°), 3 – через 24 часа осуществляли в течение 4 часов клиностатирование чашки Петри с семенами (clinostat UN-KTM2) в режиме 10 об/мин по часовой стрелке (модель микрогравитации в наземных условиях). Оценку пролиферативной активности клеток корня растений определяли по изменению прироста корня. Фотографирование проводили фотоаппаратом Fugifilm Finepix HS25EXR. Сравнительный анализ при моделировании микрогравитации интенсивности пролиферативных процессов в корневой системе риса, гороха и кресс-салата выявил более интенсивные процессы у риса и гороха. Однако сопоставление интенсивности прироста корня у всех трех растений (рис, горох, кресс-салат) при моделировании микрогравитации с приростом корня у этих же растений в естественных условиях позволяет заключить о возможности выращивания изученных растений в условиях микрогравитации для восполнения диетических потребностей космонавтов.

РОЛЬ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ.

© *А. С. Дубровина,[1] К. В. Киселев,[1] В. С. Христенко,[1] О. А. Алейнова*[1] [1]Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток dubrovina@biosoil.ru

Ca^{2+}, поступающий в клетки при воздействии на растение абиотических стрессовых факторов (температурный стресс, осмотический стресс и др.), связывает внутримолекулярные сайты Ca^{2+}-зависимых

Ser/Thr-протеинкиназ (CDPK), приводя к активации этих ферментов. CDPK фосфорилируют белковые мишени, участвующие в защитном ответе растений на стресс. Известно, что CDPK играют одну из ключевых ролей в адаптации растений к абиотическим стрессам, однако молекулярно-генетический механизм регуляции стрессовых сигнальных путей этими киназами малоизучен. Дикий виноград *Vitis amurensis* Rupr., произрастающий на Дальнем Востоке России, обладает высоким уровнем устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды. Нами клонировано 13 генов *VaCDPK* и установлено, что экспрессия 10 генов *CDPK* значительно увеличивалось при воздействии различных абиотических стрессов. Полученные нами трансгенные растения арабидопсиса и культуры клеток винограда, сверхэкспрессирующие различные гены *CDPK* дикого винограда (*VaCPK1, 3a, 9, 13, 20, 21, 26* и *29*), были более устойчивы

СОЗДАНИЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА BDNF В НЕЙРОНАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА.

© *Е.А. Епифанова, Е.В. Митрошина, А.А. Бабаев.* ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород
epifa888@mail.ru

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) – важная сигнальная молекула, участвующая в регуляции нейрогенеза, роста, выживаемости нейронов, в дифференциации нейронов, формировании синапсов, и является активным корректором метаболизма нейронов. Показано, что при нейродегенеративных заболеваниях и повреждениях ЦНС BDNF выступает в роли нейропротектора. Он способствует стимуляции эндогенной репарации функционально активных нейронных сетей. Поэтому одним из подходов может быть терапевтическое повышение уровня BDNF.

В связи с этим целью исследования является разработка стратегии и получение аденоассоциированного вирусного вектора для экспрессии в клетках мозга нейротрофического фактора BDNF. Нами были использованы стандартные техники клонирования для создания аденоассоциированного вектора с фрагментом гена BDNF.

В результате была показана работоспособность собранного вируса. Экспрессия достигала своего максимума на 5-7 день после заражения. Экспрессия была подтверждена микроскопическим, иммуноцитохимическим и ПЦР методами. Таким образом, был успешно получен и протестирован аденоассоциированный вирусный вектор, несущий фрагмент гена BDNF. к холодовому стрессу и засухе (сверхэкспрессия *VaCPK20*), солевому стрессу (сверхэкспрессия *VaCPK1, 21, 26*), а также к тепловому и осмотическому стрессам (сверхэкспрессия *VaCPK29*). Таким образом, гены *VaCPK1, 20, 21, 26* и *29* вовлечены в адаптацию дикого винограда к абиотическим стрессам.

Работа выполнена при поддержке фонда Династия и Российского научного фонда (14-14-00366).

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЯГИ К АЛКОГОЛЮ У КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТАГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРОВ ГРЕЛИНА.

© *С. О. Ереско,*[1] *П. М. Виноградов,*[2] *М. И. Айрапетов.*[2] [1]ФГБУ ВПО «НовГУ», В. Новгород
erescko.sergei@yandex.ru,
[2]ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург

Дофамин – нейромедиатор, вырабатываемый в мозге людей и животных. Грелин - системный гормон голода. Изучение грелин-дофаминовой системы привели к предположению, что она может принимать в формировании алкогольной зависимости.

Целью заключалась в исследование уровня мРНК грелина в мозге у крыс в условиях полунасильственной хронической алкоголизации и в процессе отмены алкоголя; определить зависимость по методике условной реакции предпочтения места (УРПМ) при введении антагонистов рецепторов грелина. Одним из таких антагонистов является [D-LYS^3]-GHRP-6. Серией экспериментов

показано, что интраназальное введение пептидного антагониста грелина [D-LYS^3]-GHRP-6 блокировало УРМП этанола на 30% ($p<0,05$). Экспрессия УРМП этанола после двух дней ее угашения также снижалась антагонистом грелина на 35-40%. Таким образом, грелин и его рецепторы могут регулировать уровень потребления и контролировать поиск аддитивных веществ. Поэтому лечение пациентов с алкогольной зависимостью с помощью фармакологических веществ, действующих на грелиновую систему, может оказаться перспективным направлением психофармакологии и биологической наркологии.

РЕГУЛЯЦИЯ ГЕТЕРОГЕННОСТИ МЕМБРАН ФЛАВОНОИДАМИ.

© *С. С. Ефимова, Л. В. Щагина, В. В. Малев, О. С. Остроумова.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
ssefimova@mail.ru.

Биологические мембраны играют ключевую роль в клеточной физиологии и имеют целый ряд важнейших функций, основными среди которых являются барьерная и транспортная. Поскольку молекулярная организация мембран достаточно сложна в ряде случаев, для изучения ассоциированных с мембранами процессов используют модельные системы. В качестве модельного объекта позволяющего визуально характеризовать поведение липидов и их распределение в мембране, могут служить гигантские однослойные липосомы. В работе везикулы изготавливали методом электроформации с помощью "Nanion vesicle prep pro" (Германия) (стандартный протокол, напряжение 3 В, частота 10 Гц, 1 час, 25 °C). Визуализацию латерального фазового разделения проводили путём введения флуоресцентного зонда ЛР-ДПФЭ в исходный 2 мМ раствор липида в хлороформе. Свечение метки возбуждали светом с длиной волны 543 нм (гелий-неоновый лазер). Известно, что ЛР-ДПФЭ в бислое с фазовым разделением встраивается преимущественно в жидкую неупорядоченную фазу (l_d) [Juhasz et al., Biochem. J., 2010]. При этом жидкая упорядоченная (l_o) и твёрдая (гель, s_o) фазы остаются неокрашенными [Muddana et al., Biophys. J., 2012]. Липосомы наблюдали через иммерсионный объектив 100.0×/1.4 HCX PL в Leica TCS SP5 конфокальной лазерной системы Apo ("Leica Microsystems", Германия).

В работе проводили изучение фазовой сегрегации липосом из бинарных и тройных смесей с участием липидов с низкой температурой плавления (диолеилфосфохолин (ДОФХ), дипальмитоолеоилфосфохолин (ДПОФХ), пальмитоилфосфохолин (ПОФХ)), липидов с высокой температурой плавления (сфингомиелин из мозга свиней (СМ), дипальмитоилфосфохолин (ДПФХ), тетрамиристоилкардиолипин (ТМКЛ)) и стеринов (холестерин, эргостерин, 7-дегидрохолестерин, стигмастерин). В качестве потенциальных регуляторов гетерогенности мембран липосом использовали полифенолы растительного происхождения, флавоноиды (флоретин, флорицин, 4'-гидроксихалкон, кверцетин и мирицетин).

Результаты измерений показали, что флоретин изменяет морфологию упорядоченных доменов, преобразуя гель-домены в жидкие упорядоченные области или полностью растворяя упорядоченную фазу. Более гидрофобный 4'-гидроксихалкон по сравнению с флоретином обладает выраженной активностью в отношении разрушения гель-доменов в везикулах из бинарных смесей ДОФХ и ДПФХ (ТМКЛ). Действие флорицина менее выражено из-за его более высокой гидрофильности. Следует отметить, что в независимости от липидной композиции везикул высоко гидроксилированные кверцетин и мирицетин подобными флоретину эффектами не обладают. Полученные результаты позволяют сделать предположение, что разжижающий эффект флавоноидов обусловлен их относительной гидрофобностью и способностью интеркалировать в бислой.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 16-04-00806), Программы Президиума РАН «МКБ» и Программы Президента РФ (СП-69-2015.4).

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИЧЕСКОГО СТРЕССА И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ НА СВОЙСТВА ММСК.

© *Е.Р. Андреева, Л.Б. Буравкова, О.В. Жидкова.* ГНЦ РФ-Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, olgavzhidkova@gmail.com

При повреждении ткани ММСК поддерживают гомеостаз путем замещения погибших клеток и секреции различных цитокинов. Медиаторы воспаления (TNF-alpha и др.) и гипоксия могут служить сигналами к активации регенеративных свойств ММСК. ММСК синтезируют ряд цитокинов и молекул адгезии в условиях провоспалительной активации при атмосферном содержании O_2, однако данные эффекты мало изучены в условиях гипоксии. Для моделирования гипоксического стресса ММСК помещали в условия 1% O_2, 24 ч, провоспалительную активацию проводили с помощью TNF-alpha, 5 нг/мл, 24 ч. Далее производили оценку способности клеток in vitro к миграции, пролиферации, образованию КОЕ-ф, экспрессии молекул адгезии (ICAM-1, ITGA5, CD44, VCAM-1, N-cadherin, ITGB3) и секреции цитокинов (VEGF, TGF-beta, ИЛ-6,-8). Было показано, что гипоксический стресс сам по себе и в сочетании с активацией TNF-alpha не влияет на способность к образованию КОЕ-ф, пролиферацию, миграцию ММСК. Активация ММСК TNF-alpha в условиях гипоксического стресса приводила к достоверному повышению уровня экспрессии ICAM-1, ITGA5 и к повышению секреции ИЛ-6, ИЛ-8, VEGF. Таким образом, воздействие неблагоприятных факторов тканевого окружения приводит изменению экспрессии молекул адгезии и секреции цитокинов ММСК, что играет важную роль в репаративном ремоделировании ткани.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-15-00693).

ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АМФИФИЛОВ НА КАНАЛО-ОБРАЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ СИРИНГОМИЦИНА Е.

© *А. А. Захарова[1], С. С. Ефимова[1], Л. В. Щагина[1], О. С. Остроумова[1].* [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург zaza2187@bk.ru

Циклические липопептиды представляют группу фитотоксинов, продуцируемых *Pseudomonas* spp. Одним из наиболее значимых представителей является циклический липодепсипептид сирингомицин Е (СМЕ). Известно, что СМЕ активен в отношении клинически важных возбудителей грибковых заболеваний человека, в том числе, и патогенной микобактерии *Mycobacterium smegmatis.* Показано, что СМЕ-каналы формируются при непосредственном участии мембранообразующих липидов, являясь ассиметричными пептид-липидными порами. Подобное строение определяет возможность регуляции каналообразующей активности (КОА) СМЕ посредствам модификации механических свойств мембраны. В свою очередь, положительный заряд пептидной «головы» СМЕ обуславливает выраженную потенциал-чувствительность образуемых этим липопептидом пор. В связи с разносторонними возможностями модуляции активности СМЕ актуальной задачей является установление преобладающих факторов регуляции КОА этого липопептида. В качестве инструментов, использующихся для варьирования электрических и механических характеристик модельных и клеточных мембран, применяются низкомолекулярные модуляторы (НМ): флавоноиды, стириловые и ксантеновые красители, тиреоидные гормоны (ТГ) и местные анестетики (МА). В таблице 1 представлены результаты изучения влияния различных НМ на электрические (граничный потенциал мембраны (φ_b)) и механические (температура плавления мембранообразующих липидов (T_m)) свойства мембраны, а также на КОА липопептида (отношение интегрального СМЕ-индуцированного тока в присутствии и в отсутствие НМ (I/I_0)).

Таблица 1. *Изменение физико-химических свойств мембраны и каналообразующей активности СМЕ под действием НМ.*

концентрация	*модулятор*	$\Delta\varphi_b$, мВ	ΔT_m, °C	I/I_0
	флавоноиды			
20 мкМ	флоретин	–140 ± 8	1.5	2000 ÷ 30000
	стириловые красители			
10 мкМ	RH 421	130 ± 20	0.1	0.01 ÷ 0.7
	ксантеновые красители			
2.5 мкМ	бенгальский розовый	–121 ± 9	0.2	174.0 ± 43.0
	флоксин	–83 ± 4	0.2	54.0 ± 15.8
	эритрозин	–65 ± 6	0.2	52.5 ± 20.0
	эозин У	–5 ± 2	0.2	2.2 ± 0.5
	флуоресцеин	–6 ± 2	0.2	1.1 ± 0.4
	тиреоидные гормоны			
50 мкМ	тироксин	–61 ± 7	0.1	0.9 ± 0.3
50 мкМ	трийодтиронин	–58 ± 9	0.5	0.17 ± 0.03
	местные анестетики			
10 мМ	прокаин	1 ± 1	0	1.0 ± 0.1
1 мМ	тетракаин	53 ± 4	0.6	3.1 ± 0.8

Как видно из таблицы 1, наблюдается корреляция между изменением электрических свойств мембраны и КОА изучаемого липопептида под действием флавоноидов, стириловых и ксантеновых красителей. В свою очередь, преобладающим механизмом действия ТГ и МА на СМЕ-индуцированный ток является модуляция механических свойств мембраны. Подобные результаты могут быть объяснены различным погружением в бислой тестируемых НМ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 14-14-00565.

НОВЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ИММУНОТОКСИНЫ НА ОСНОВЕ ПСЕВДОМОНАДНОГО ЭКЗОТОКСИНА А.

© *Т.А. Здобнова,[1,2] Е.А. Соколова,[1,2] О.А. Стремовский, [2] Г.М. Прошкина, [2] И.В. Балалаева, [1] С.М. Деев[2]*. [1]Институт биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, [2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Очинникова.
t.zdobnova@mail.ru

Разработка новых методов и подходов для терапии онкологических заболеваний на сегодняшний день — одна из наиболее актуальных и активно развивающихся областей биологии и медицины. Хотя основными методами лечения со́лидных опухолей по-прежнему остаются хирургия и традиционная химиотерапия, благодаря прогрессу в изучении молекулярных основ канцерогенеза, в последние десятилетия все бо́льшую роль начинает играть таргетная (направленная) терапия. Этот подход основан на использовании токсических агентов направленного действия, избирательно связывающихся с опухолевыми клетками, экспрессирующими определенный, характерный только для них маркер, и вызывающих их гибель.

Нами были созданы новые противоопухолевые рекомбинантные агенты белковой природы с использованием фрагмента PE40 псевдомонадного экзотоксина А в качестве токсического модуля; в качестве направляющих модулей были использованы анти-HER2 антитело формата scFv (4D5scFv-PE40) и искусственный белок с анкириновыми повторами DARPin29 (DARPin-PE40).

Исследования на клетках опухолей человека в культуре показали, что полученные иммунотоксины связываются с HER2-положительными клетками и вызывают их апоптоз, причем существует ярко выраженная корреляция между уровнем экспрессии рецептора HER2 и цитотоксическим действием белка. Введение DARPin-PE40 и 4D5scFv-PE40 иммунодефицитным мышам линии nude с ксенографтными подкожными и интраперитонеальными HER2-положительными опухолями человека привело к длительному ингибированию роста этих опухолей.

Полученные данные свидетельствуют о том, что новые иммунотоксины DARPin-PE40 и 4D5scFv-PE40 — перспективные потенциальные терапевтические агенты для таргетной терапии HER2-положительных опухолей.

МИКРОДИССЕКЦИЯ ХРОМОСОМ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЁТОК КАК ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ГЕТЕРОХРОМАТИНОВЫХ РАЙОНОВ ХРОМОСОМ.

© *А. М. Злотина*[1], *Т. В. Куликова*[1], *Н. Косякова*[2], *Т. Лир*[2], *А. В. Красикова*[1]. [1]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
alla.krasikova@gmail.com,
[2]Институт генетики человека, Йенский университет им. Фридриха Шиллера, Йена, Германия.

Участки хромосом, обогащенные маркерами гетерохроматина, зачастую представлены последовательностями, состоящими из высокоповторяющихся элементов, как тандемных, так и диспергированных повторов ДНК. Расшифровка и сборка таких районов хромосом в проектах по секвенированию геномов значительно затруднены. Одним из подходов к установлению генетического состава участков гетерохроматина служит микродиссекция хромосом с последующей расшифровкой полученных образцов ДНК. Вместе с тем, для представителей класса птицы, микродиссекция гетерохроматиновых участков хромосом в стадии метафазы митоза представляет собой нетривиальную задачу. Это в первую очередь связано с наличием в кариотипах птиц многочисленных микрохромосом и небольшими размерами хромосом. Мы представляем новый подход к расшифровке гетерохроматиновых участков хромосом птиц с помощью микродиссекции гигантских хромосом типа ламповых щеток, характерных для растущих ооцитов.

Ранее мы показали, что механическая микродиссекция гигантских хромосом типа ламповых щёток позволяет получать специфичные зонды для проведения FISH, а также ДНК-библиотеки для расшифровки диссектируемых районов с помощью технологий секвенирования следующего поколения (next generation sequencing, NGS). Минимальной расшифрованной структурной единицей оси хромосомы типа ламповых щеток в этой работе послужил хромомер размером 2–4 млн.п.н.

В настоящей работе с помощью механической микродиссекции мы получили зонды для проведения FISH для центромерных районов макрохромосом и для полиморфных коротких плеч субметацентрических микрохромосом японского перепела. Мы можем заключить, что механическая микродиссекция хромосом типа ламповых щёток позволяет получить специфичные и яркие зонды к гетерохроматиновым участкам хромосом.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00131). Часть исследований выполнена при технической поддержке и с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Хромас» (Санкт-Петербургский государственный университет).

ОЦЕНКА РЕЗИСТЕНТНОСТИ СТВОЛОВОГО КОМПОНЕНТА ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ К 5-ФТОРУРАЦИЛУ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ.

© *М. А. Иванова,*[1] *С. А. Кошкин,*[2] *Е. Н. Толкунова.*[2] [1]Факультет химической и биотехнологии
Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)
ima-9811329780@mail.ru,
[2]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

По данным Всемирной организации здравоохранения за 2012 год было зарегистрировано более 14 миллионов новых случаев онкологических заболеваний, из них 694000 случаев – рак толстой кишки (4 место в общей статистике онкозаболеваемости). Результаты многочисленных исследований показали, что солидные опухоли существуют в состоянии гипоксии. Также известно, что в них существуют минорные популяции, называемые раковыми стволовыми клетками (РСК), отличающиеся повышенной резистентностью к воздействию цитостатических агентов. Предполагается, что именно недостаток кислорода оказывает существенное влияние на механизмы устойчивости РСК к цитостатикам.

Для проверки данной гипотезы были выделены две первичные культуры рака толстой кишки БСК1 и БСК6. Обогащение

культур по стволовому компоненту проводили при помощи лентивирусной репортерной системы SOREX6x. Данная конструкция содержит шестикратно повторённый сайт для связывания стволовых маркеров Oct4 и SOX2 из промотора стволового маркера NANOG и ген устойчивости к пуромицину. Для каждой культуры было отобрано по несколько клонов. Клоны охарактеризовали по экспрессии стволовых маркеров Oct4, SOX2 и NANOG. Затем имитировали условия гипоксии кобальтовым методом и проводили обработку клонов 5-Фторурацилом. Оценивали жизнеспособность методом МТТ.

Показали, что в условиях гипоксии резистентность к 5-Фторурацилу клонов полученных из линии БСК 6, возрастает. Не для всех клонов, однако, рост резистентности является статистически достоверным, клоны проявили различия. Доклад содержит статистически обработанные результаты измерения жизнеспособности клеток каждого клона в условиях нормоксии и гипоксии при обработке цитотаксическим агентом в культуре.

Работа выполнена в Институте цитологии РАН под руководством к.б.н. Толкуновой Е. Н. и при финансовой поддержке гранта РНФ № 14-50-00068.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕТЕРОХРОМАТИНА В ГЕНОМНЫХ СБОРКАХ СВИНЬИ *SUS SCROFA*.

© *Н. Г. Иванова, В. Н. Стефанова, И. В. Матвеев*. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
nadyaxs@gmail.com.

Конститутивный гетерохроматин занимает более 10% геномов высших эукариот, он составляет основу центромер и теломер. Однако его структура и функция остаются в значительной мере не изученными. Конститутивный гетерохроматин состоит главным образом из тандемных повторов (ТП). Эта работа посвящена обнаружению и анализу первичной структуры больших ТП (длина поля ТП не менее 2 Кб) из 4 секвенированных геномов свиньи *Sus scrofa* разной степени сборки. Методами бионформатики обнаружено 126 семейств ТП, 12 из которых являются общими для всех проанализированных пород. Показано, что в каждой из геномных сборок существуют породоспецифичные ТП. Среди выявленных семейств ТП оказалось много ТП, мономеры которых образованы из частей ретроэлементов. Большинство семейств ТП, мономеры которых состоят из частей длинных диспергированных повторов (LINE) сходны с ТП в геномах человека и мыши. Эти ТП образованы из фрагмента 3'- конца длиной 2 т.п.н. Вместе с тем в геноме свиньи найдено большое количество полей семейства ТП, в основе которого лежит короткий диспергированный повтор (SINE). Повышенное содержание этого семейства ТП объясняет особенности распределения гибридизационного сигнала SINE по плечам хромосом свиньи в отличие от хромосом человека и мыши. Для 6 из обнаруженных семейств ТП удалось подобрать олигонуклеотидные пробы и с помощью метода олиго-FISH картировали их либо в прицентромерных районах акроцентрических либо суб- и метацентрических хромосом свиньи.

УКОРОЧЕННАЯ ФОРМА alpha-ТУБУЛИНА ОБНАРУЖЕНА В СОСТАВЕ ПРОТЕАСОМ-АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ.

© *Е.Ю. Иванова,[1,2] Т.О. Артамонова,[3] М.А. Ходорковский,[3] А.С. Цимоха.[2]* [1]Факультет химической и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета), [2]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [3]Центр Нанобиотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, ivanoval.027@gmail.com

26S протеасома осуществляет избирательную деградацию белков в клетке, которая может идти по убивитин-зависимому или убиквитин-независимому пути. Она представляет собой мультисубъединичный белковый комплекс, в состав которого входит

20S частица, обладающая протеолитической активностью, и один или два 19S регуляторных комплекса. Сегодня прослеживается связь между патогенезом различных заболеваний, включая нейродегенеративные, аутоимунные и онкологические, и нарушениями в работе убиквитин-протеасомной системы. Поэтому так важно широкое и комплексное изучение механизма работы убиквитин-протеасомной системы и способов регуляции функционирования протеасом в клетке. Существует ряд белков с известными и неизвестными функциями, которые постоянно или краткосрочно связываются с протеасомами, и условно поделены на две группы: белки убиквитиновой системы и белки, регулирующие активность и функции протеасом за счет прямого связывания. Определение белков, взаимодействующих с протеасомами, является одним из важных этапов в понимании функций протеасом в клетке и механизмов их регуляции. Для решения этой задачи на примере клеток миелогенной лейкемии человека использована стратегия аффинной очистки протеасом с последующим масс-спектрометрическим анализом. Протеасомы очищали из клеток линии K562, стабильно экспрессирующих субъединицу 20S протеасомы beta7, меченную по С-концу HTBH-пептидом. С помощью MALDI-ICR-масс-спектрометрии идентифицированы все субъединицы 26S протеасомы, а также регуляторы PA200 и PA28gamma. Мы показали, что с протеасомами ассоциированы компоненты убиквитин-протеасомной системы (убиквитин, убиквитин-лигаза UBE3A и деубиквитиназа UCHL5), белки теплового шока (HSPA5, 8, 9: HSPA1A; HSPD1 и HSP90AB1) и некоторые белки цитоскелета (актин, alpha-актинин 4 и alpha- и beta-тубулины). Белки alpha- и beta-тубулины участвуют в формировании микротрубочек. Есть несколько генов alpha- и beta-тубулинов, и они высоко консервативны как между собой, так и между видами. Для многих белков семейства alpha-тубулинов (48-49 кДа) показано существование различных изоформ – результат альтернативного сплайсинга. Интересно, что вестерн-блот анализ с использованием антител, специфичных к alpha-тубулину (*TUBA4A*), выявил присутствие в комплексе с очищенными протеасомами укороченной версии белка с молекулярной массой, соответствующей 40 кДа в системе SDS-электрофореза. Мы предполагаем, что присутствие тубулинов в списке белков, ассоциированных с протеасомами, определяет транспорт протеасом внутри клетки. Кроме того, такая укороченная форма alpha-тубулина может быть результатом не альтернативного сплайсинга, а процессинга alpha-тубулина протеасомами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (15-04-08128).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ КАПСУЛЫ КАРИОСФЕРЫ ООЦИТОВ ЗИМУЮЩИХ ЛЯГУШЕК *RANA TEMPORARIA*.

© *Н.В. Ильичева*[1], *Д.Ю. Кирюшина*[2], *Г.Н. Почукалина*[1]. [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
nad9009@yandex.ru,
[2]Биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета

В ооцитах многих животных на стадии диплотены профазы I мейоза инактивированные хромосомы организованы в кариосферу. У травяной лягушки *Rana temporaria* вокруг кариосферы образуется внешняя капсула, состоящая из волокнистого материала, который окружает многочисленные ядрышки. В настоящей работе предпринята идентификация части белков, входящих в состав капсулы кариосферы *R. temporaria*. Проводили непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание тотальных препаратов ядер ооцитов *R. temporaria* с помощью антител к некоторым компонентам ядерного матрикса и факторам сплайсинга. В составе волокнистого компонента капсулы обнаружены белки актин, ламины A, C и B, нуклеопорин Nup93 и топоизомераза 2. Ламины и актин, по-видимому, формируют волокна и псевдомембраны в составе капсулы, а присутствие Nup93 согласуется с электронномикроскопическими данными о наличии в капсуле псевдопоровых комплексов. Обнаружение Sm-белков мяРНП и собственно мяРНП в составе материала капсулы кариосферы *R. temporaria* подтверждает полученные результаты в капсуле ооцитов

некоторых насекомых. Обсуждается роль капсулы кариосферы в процессах, связанных с экспрессией генома.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», грантов РФФИ (№ 15-04-01857 и 16-34-00714) и РНФ (№ 15-15-20026).

ДИНАМИКА МЕТАБОЛОМА БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *FUCUS VESICULOSUS* ПРИ ИЗМЕНЕНИИ СОЛЁНОСТИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ПОЛОЖЕНИЯ НА ЛИТОРАЛИ.

© *А.А. Ильин, Р.К. Пузанский, Е.Р. Тараховская, В.В. Емельянов, М.Ф. Шишова*. Биологический Факультет Санкт-Петербургского Государственного Университета, Санкт-Петербург
tetpapx@bk.ru

Fucus vesiculosus - важный объект, употребляемый в пищу и использующийся для получения лекарственных препаратов. Считается, что фукоиды являются самыми лучшими накопителями йода, содержат различные антиоксиданты, например, фукоксантин. Ряд метаболитов бурых водорослей может быть использован в качестве противораковых, противовоспалительных, противодиабетических и антиоксидантных препаратов. Особенно интересны адаптации *F. vesiculosus*, выработанные в связи с прикреплённым образом жизни и жёсткими меняющимися условиями среды обитания. При этом он мало изучен, в частности не исследован его метаболом. В данном исследовании был поставлен вопрос об изменении метаболома *F. vesiculosus* в ответ на воздействия таких факторов внешней среды как солёность, приливно-отливные течения и положение на литорали. В результате был охарактеризован метаболом, выявлены наиболее важные метаболиты, связанные с влиянием абиотических стрессоров, произведено картирование метаболитов.

ИССЛЕДОВНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ II ТИПА *CFR*9I

© *О. А. Казанцева, М. О. Нагорных.* Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, Пущино
Olesia-alis@rambler.ru.

Система рестрикции-модификации (СРМ) – широко распространенная ферментативная система бактерий, основной функцией которой является защита бактериальной клетки от чужеродного генетического материала (бактериофагов, плазмид). СРМ состоят из двух генов, кодирующих два фермента: эндонуклеазу рестрикции (ER) и метилтрансферазу (M). ER вносит двухцепочечные разрывы по уникальным сайтам, а M защищает хозяйскую ДНК от действия ER путем внесения модификаций в те же сайты. СРМ способны быстро распространятся в популяции за счет процессов горизонтального переноса генов. Таким образом, данные системы должны иметь четко скоординированную регуляцию во избежание расщепления неметилированной хозяйской ДНК нового бактериального хозяина и для стабильного поддержания СРМ в клетках.

В основном экспрессия генов СРМ регулируется на транскрипционном уровне с помощью C-белков. Однако в СРМ типа II *Cfr*9I не было обнаружено регуляторов транскрипции, типичных для СРМ типа II. Исследование СРМ типа II *Cfr*9I позволит выявить новые механизмы регуляции экспрессии генов в системах защиты бактерий от проникновения бактериофагов.

СРМ типа II *Cfr*9I – это линейно-ориентированный оперон, состоящий из двух конвергентно расположенных генов. Стартовый кодон мРНК гена *res* и стоп-кодон мРНК гена *met* перекрываются. В *Cfr*9I обнаружено и охарактеризовано два промотора. С промотора *met*P транскрибируется бицистронная мРНК, кодирующая оба фермента системы. Промотор *res*P локализован перед *res* в структурной части *met*, с него синтезируется моноцистронная мРНК, кодирующая только ER. Мы провели сравнительный анализ

промоторов *in vitro* и *in vivo*, который показал, что *met*P сильнее *res*P в 4 раза. *res*P, по-видимому, является вспомогательным и обеспечивает базальный уровень ER в момент становления СРМ в генетическом окружении нового хозяина. Ранее в *Cfr*9I биоинформатически в районе последовательности Шайн-Дальгарно гена *res* был обнаружен повтор, кодирующий устойчивую вторичную структуру мРНК (шпильку). Нами был проведен сравнительный анализ активности репортерного гена *lacZ* трансляционно слитого с фрагментами ДНК *Cfr*9I. Отмечено, что делеция ДНК последовательности, кодирующей шпильку в мРНК, приводит к увеличению экспрессии гена *lacZ* в 4 раза. Методом обратной транскрипции и qPCR выявлено, что наличие шпильки в мРНК значительно снижает уровень транскрипции с *res*P. Вероятно, это происходит из-за преждевременной деградации мРНК за счет ареста трансляции. С помощью приложения RNAfold выявили, что оба важных элемента инициации трансляции – область Шайн-Дальгарно и стартовый кодон мРНК *res* попадают в структуру шпильки. Предполагается, что это является ключевым фактором негативной регуляции *res* в СРМ *Cfr*9I.

RAB5-RAB7 КОНВЕРСИЯ ПУТЕМ СЕГРЕГАЦИИ МЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА РЕЦЕПТОРА ЭФР.

© *Р. С. Каменцева,*[1] *В. В. Кошеверова,*[1] *М. В. Харченко,*[1] *Е. С. Корнилова.*[1,2] [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, rkamentseva@yandex.ru,
[2]Санкт-Петербургский Государственный Университет.

Важнейшими регуляторами эндоцитоза являются малые ГТФазы семейства Rab. Так, ранние этапы эндоцитоза регулирует Rab5, а поздние – Rab7, который появляется на эндосоме в ходе так называемой Rab5-Rab7 конверсии. Существует две гипотезы о механизме Rab5-Rab7 конверсии. Согласно общепринятой гипотезе конверсия происходит путем постепенной диссоциации Rab5 и его эффекторов, таких как EEA1, и одновременной ассоциации Rab7 на одном и том же участке мембраны эндосомы. Подобный способ конверсии был показан для таких грузов, как LDL и BSA. Однако в ряде работ с использованием вирусов обнаружено, что Rab5-Rab7 конверсия может происходить путем сегрегации доменов одной эндосомы, с которыми ассоциированы разные ГТФазы. С помощью конфокальной микроскопии линии HeLa, трансфецированных Rab7-DsRed или ко-трансфецированных EEA1-EGFP и Rab7-DsRed или Rab5-mCherry, мы показали, что при эндоцитозе рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР), стимулированного добавлением ЭФР, конъюгированного с квантовыми точками (ЭФР-Qds), Rab5-Rab7 конверсия происходит согласно второй модели: ЭФР-позитивная везикула, которая несет на своей мембране Rab7, сегрегирует из гибридной эндосомы, при этом Rab5 отделяется вместе с EEA1.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00068) и при финансовой поддержке ФАНО с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ В ГИДРОФОБНОМ КОРЕ ТРОПОМИОЗИНА ALA155THR НА МЕХАНИЗМЫ АКТИН-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ.

© *О. Е. Карпичева,*[1] *А. А. Чернев,*[1] *И. Морачевска,*[2] *Ю. С. Боровиков.*[1] [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, olexiya6@ya.ru,
[2]Университет им. Казимира Великого, Быгдощ.

Тропомиозин играет существенную роль в актин-зависимой регуляции мышечного сокращения, в комплексе с тропонином определяя характер связывания миозиновых головок с тонкими нитями в зависимости от концентрации ионов кальция в саркомере. Молекула тропомиозина представляет собой суперспираль из двух α-спиральных тяжей, последовательность которых характеризуется

наличием непрерывных гептоповторов *a-b-c-d-e-f-g*, где в позициях *a* и *d* располагаются преимущественно гидрофобные аминокислоты, образующие гидрофобный кор, а в позициях *e* и *g* – сильно заряженные аминокислоты. Радиус суперспирали тропомиозина, ее изгиб и стабильность варьируются по длине молекулы и зависят от аминокислот в гидрофобном коре. Такие аминокислоты, как лейцин, изолейцин, валин, метионин и тирозин стабилизируют суперспираль, то есть способствуют поддержанию ее структуры. Тогда как аланиновые кластеры и полярные аминокислоты, наоборот, дестабилизируют суперспираль, что, несомненно, имеет функциональное значение.

Известны несколько аминокислотных замен в гидрофобном коре тропомиозина, приводящих к наследственным мышечным заболеваниям человека. Одна из таких мутаций Ala155Thr в гене TPM3 обнаружена при немалиновой миопатии, характеризующейся слабостью и гипотонией скелетных мышц [Kiphuth et al., 2010, J. Neurol. 257:658–60]. Эта мутация приводит к нарушению четвертого аланинового кластера тропомиозина Ala151-Ala155-Ala158 и встраиванию в полипептидную цепь неканонического полярного остатка треонина с большей по размеру боковой цепью. Предположено, что такая замена может привести к уширению суперспирали в этой области, изменению ее изгиба и характера электростатических взаимодействий между тропомиозином и актином. В настоящей работе α-тропомиозин с мутацией Ala155Thr был связан с тонкими нитями одиночных мышечных волокон и с помощью метода поляризационной микрофлуориметрии исследованы изменения позиции тропомиозина и структурного состояния субдомена-1 актина и моторного домена головки миозина при моделировании различных промежуточных стадий АТФазного цикла. Обнаружено, что мутация Ala155Thr при низкой концентрации кальция приводит к аномальному смещению тропомиозина на актиновой нити в позицию, характерную для активированного состояния мышцы (в открытую позицию), что стимулирует включение дополнительного числа актиновых мономеров и образование сильных форм связывания головок миозина с актином, существенных для генерации силы. Предположено, что в присутствии мутации Ala155Thr в тропомиозине тропонин утрачивает способность выключать тонкие нити, что является причиной нарушения сократительной функции при немалиновой миопатии, связанной с этой мутацией.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00454.

РАННИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА КРЫС ПРИ ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ.

© *В. Б. Карякин.*[1,2] [1]Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН им. И. В. Сеченова, Санкт-Петербург, vbkrus@mail.ru,
[2]Биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета.

Эпилепсия – тяжелое заболевание нервной системы, проявляющееся в спонтанном появлении периодических судорог. В основе эпилепсии лежит нарушение баланса между тормозными и возбуждающими сигналами в нервной системе. Сложность заболевания связана с переходом его в хроническую стадию, при которой у пациентов развивается устойчивость к антиэпилептическим препаратам. В настоящее время существует множество моделей изучения хронической эпилепсии, в том числе пилокарпиновая модель височной эпилепсии. Гиппокамп – важная часть лимбической системы, наиболее подвержена повреждению при височной эпилепсии человека и животных. В данной работе мы изучали морфологические и функциональные изменения в нейронах гиппокампа крыс через 24 часа после введения пилокарпина. Нами было выявлено снижение на 29,41% числа тормозных интернейронов, синтезирующих кальцийсвязывающий белок кальретинин в зоне CA1 гиппокампа через сутки после введения пилокарпина. Кроме того мы обнаружили уменьшение содержания глутаматдекарбоксилазы GAD67 (фермент синтеза тормозного медиатора гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК)) на 28%, а

также снижение содержания GAT1 (мембранный транспортер ГАМК) на 30% в гиппокампе через 24 часа после введения пилокарпина.

СОЧЕТАНИЕ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ И ГИПЕРТЕРМИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ.

© *А. И. Кизенко,*[1] *Е. Ю. Смирнов,*[2] *Е. К. Зайкова,*[2] *А. В. Петухов,*[1,2] *Н. А. Барлев.*[1]
[1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, alyona.kizenko@gmail.com,
[2]Санкт-Петербургский государственный технологический институт, Санкт-Петербург.

Система направленной активации апоптоза с использованием «суицидальной кассеты» используется еще с 90х годов прошлого века. Данная система основана на искусственной сверхэкспрессии в раковых клетках «суицидального гена» тимидинкиназы вируса герпеса. Тимидинкиназа – фермент, катализирующий превращение тимидина в активный тимидинмонофосфат для последующего встраивания его в цепь ДНК. Аналог нуклеотидов ацикловир также является субстратом для данного фермента. При встраивании его фосфорилированной формы в ДНК клетки, может происходить сестринский хроматидный обмен, хромосомные аберрации и запуск программированной клеточной смерти. Активированный ацикловир-трифосфат переходит также и в соседние клетки через щелевые контакты, поэтому наблюдается и гибель окружающих клеток (так называемый «эффект свидетеля»). Апоптоз, вызываемый ацикловиром, идет по пути внутренней активации.

Одной из форм терапии некоторых типов рака, включая рак шейки матки, является локальная гипертермия. Суть её заключается в нагревании опухоли до температуры 42^0 С, тем самым увеличивается эффект последующей лучевой или химиотерапии. В нашей работе было показано, что сочетанная терапия, включающая в себя трансфекцию конструкцией с тимидинкиназой с помощью реагента TurboFect, обработку ацикловиром и нагревание до 42^0 С, радикально сокращает количество раковых клеток линии HeLa (рак шейки матки), вызывая у них апоптоз. Разница с клетками, не подвергавшимися нагреванию, составляет примерно 10%, в то время как отличие от контрольных клеток составляет почти 30%. Был проведен подсчет колоний, выросших на чашках Петри после воздействия. Дополнительно был сделан тест на выявление апоптотических клеток путем обработки аннексином V и последующем подсчёте клеток на проточном цитометре FACS. Скорее всего, сенсибилизация клеток при помощи гипертермии будет увеличивать эффект от «суицидальной кассеты» и in vivo. Таким образом, данная сочетанная терапия может стать новым подходом к лечению онкологических заболеваний.

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА СТИЛЬБЕНОВ В КЛЕТКАХ ВИНОГРАДА.

© *К.В. Киселев*, Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток
kiselev@biosoil.ru

Растения являются источником широкого спектра ценных биологически активных веществ, среди которых особое место занимают стильбены. Стильбены являются природными фитоалексинами и представляют собой фенольные соединения со структурой C6-C2-C6. Биосинтез стильбенов лучше всего изучен у представителей семейства Виноградные, где стильбены являются производными резвератрола (3,5,4'-тригидроксистильбен). *Т*-резвератрол – мощный антиоксидант, который имеет большой потенциал для создания на его основе биологически активных добавок и лекарственных средств. *Т*-резвератрол в клетках винограда в результате дальнейших модификаций может превращаться в другие стильбены, например, в виниферины (окисление), птеростильбен (метилирование) или пицеид (гликозилирование). В настоящее время основные этапы молекулярно-генетической регуляции биосинтеза данных веществ изучены недостаточно. Целью нашей работы является изучение биосинтеза и продукции стильбенов в клетках винограда, а также исследование основных молекулярных механизмов, регулирующих биосинтез стильбенов. С помощью HPLC-MS-UV нами изучен спектр и содержание стильбенов у дикорастущего винограда *Vitis amurensis* Rupr.

и культур клеток этого растения. Нами установлено, что Ca^{2+} сигнальная система и Ca^{2+}-зависимые протеинкиназы играют важную роль в регуляции биосинтеза стильбенов в клетках винограда.
Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (14-14-00366).

ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ МОДЕЛИ ИМИХИМОД ИНДУЦИРОВАННОГО ПСОРИАЗОПОДОБНОГО ДЕРМАТИТА У МЫШЕЙ.

© *П. А. Козырев, Т. А. Сазонова*. ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, kozyrevpa@gmail.com.

Около 2-3% людей страдают псориазом – хроническим аутоиммунным заболеванием, поражающим преимущественно кожные покровы. В настоящее время существует целый ряд различных подходов к терапии псориаза, однако все они приводят лишь к временным периодам ремиссии и обладают серьезными побочными эффектами. В связи с этим актуальной задачей является разработка и изучение моделей для тестирования эффективности лекарственных препаратов *in vivo*. Ранее, в ряде работ было показано, что имихимод способен вызывать псориазоподобный дерматит у мышей. Плюсом данной модели является ее простота и дешевизна. В серии проведенных нами экспериментов наблюдалась характерная картина псориазоподобного поражения, как на макроскопическом (утолщение, покраснение и шелушение кожи) так и на гистологическом уровнях (акантоз, гиперкератоз, паракератоз, лейкоцитарная инфильтрация) в течение всего эксперимента. Адекватность модели была проверена в эксперименте с метотрексатом - одним из широко применяемых препаратов для лечения псориаза. Было показано, что введение метотрексата значительно снижает признаки поражения кожи в ключевые сроки развития имихимод индуцированного псориазоподобного дерматита. Таким образом, мы воспроизвели, описали, и верифицировали модель псориазоподобного дерматита мышей, которая будет использована в нашей работе по тестированию новых противопсориатических препаратов.

РЕГУЛЯЦИЯ КАРБОНОВЫМИ КИСЛОТАМИ В УСЛОВИЯХ ТЕРМОСТРЕССА ПЕРЕНОСА ПРОТОВ ЧЕРЕЗ ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ КЛЕТОК *NITELLA FLEXILIS.*

© *Е. А. Козырева, Е. Н. Крытынская.* Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь
krylena@inbox.ru.

В работе исследован H^+- обмен плазматической мембраны клеток *Nitella flexilis* со средой в условиях 1-5-суточного воздействия гипотермии и карбоновых (салициловой и янтарной) кислот. Начальную оценку проводили опосредовано, путем получения кривых доза- эффект, отражающих зависимость между длительностью обработок клеток растворами карбоновых кислот (10^{-6} - $5 \cdot 10^{-5}$моль/л) в условиях хладотермостата (+4 ± 2 ºС) и фотоиндуцируемыми сдвигами потенциала на мембране. С ростом концентрации карбоновых кислот на фоне длительной гипотермии (3 и 5 суток) регистрировали прирост фотоиндуцированной гиперполяризации. Салицилат вызывал сдвиги сильнее, чем янтарная кислота. Максимальный сдвиг мембранного потенциала наблюдали при внесении кислот на фоне 1-суточной гипотермии в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, 10^{-5} моль/л при этом служила концентрацией половинного эффекта. Обработка мгновенных вольт-амперных характеристик H^+-АТФазы, полученных с применением методики микроэлектродных исследований и техники фиксации потенциала (-180 мВ) на мембране, свидетельствовала о возможности регуляции карбоновыми кислотами в концентрации 10^{-5} моль/л переноса протонов при длительном температурном стрессе (продолжительностью 3 и 5 суток). К 5 суткам воздействия гипотермии карбоновые кислоты способствовали восстановлению в разной степени активности протонного насоса, о чем свидетельствовал прирост проводимости при потенциале реверсии тока.

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ УАБАИНА И ВКЛЮЧЕНИЯ ЦАМФ ПРИ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА НЕЙРОНОВ КОРЫ МОЗГА КРЫС.

© *А. А. Кокорина,*[1] *П. А. Абушик,*[2] *С. М. Антонов.*[2] [1]Санкт-Петербургский Государственный Университет, [2]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, polinaabushik@gmail.com

Чрезмерная активация рецепторов глутамата (Glu) вовлечена в патогенез многих нейродегенеративных расстройств, развитие которых сопряжено с увеличением концентрации серосодержащей аминокислоты гомоцистеин (HCY) в плазме крови и цереброспинальной жидкости. Наряду с Glu, HCY может активировать рецепторы Glu NMDA и mGluR5 типа. Ранее нами было показано, что 100 мкМ HCY, подобно 100 мкМ Glu, вызывают апоптоз в ~30% нейронов после 24 часов действия. Интересно, что нейротоксичность HCY и Glu полностью предотвращалась субнаномолярными концентрациями уабаина (Oua, 0,1 и 1 нМ), так же эффективными в данном случае были 1 мкМ форсколина (FK) или 1 мкм CGRP, эндогенного активатора аденилатциклазного сигнального пути. Для выявления сигнальных каскадов, вовлеченных в нейропротекторные эффекты, Oua, FK или CGRP 24ч действовали совместно с ингибитором PKA (1мкМ), блокатором PKC (хелеритрин 0,6 мкМ) или блокатором CaMKII (KN93 3 мкМ). Эффект активации цАМФ FK или CGRP полностью предотвращался ингибитором PKA и KN93, указывая на участие PKA и CaMKII каскадов. Интересно, что эффект Oua не был блокирован ингибиторами, тем самым, исключая участие данных внутриклеточных каскадов в механизме его действия.

Работа поддержана грантами РФФИ 14-04-00227, 16-04-00653 и Стипендией Президента РФ.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЖСС ЛИЧИНОК КОСТИСТЫХ РЫБ.

© *Е. А. Кондакова,*[1] *В. И. Ефремов,*[1] *В. А. Назаров*[1]*, И. В. Неклюдова*[2]*, В. А. Богданова.*[3] [1] Биологический факультет Санкт-Петербургского Государственного Университета 23eak@mail.ru [2]Биологический факультет Московского государственного университета, [3]Государственный научно-исследовательский институт озерного и речного рыбного хозяйства им. Л.С. Берга, Санкт-Петербург.

Желточный синцитиальный слой (ЖСС) Teleostei — это многофункциональная провизорная система, представляющая собой симпласт с многочисленными полиплоидными полиморфными ядрами, локализованный на поверхности желточной сферы. ЖСС выполняет морфогенетическую, иммунную и трофическую функции. Цель данной работы – сравнительное исследование организации ЖСС в развитии семи видов Костистых рыб: *Danio rerio, Cyprinus carpio* (Cyprinidae, Cypriniformes), *Misgurnus fossilis* (Cobitidae, Cypriniformes); *Coregonus peled, Coregonus muksun, Coregonus nasus, Stenodus leucichthys nelma* (Coregonidae, Salmoniformes). Обобщены как опубликованные нами ранее, так и новые данные, полученные с помощью гистологических методов и трансмиссионной электронной микроскопии (*D. rerio*). ТЭМ и некоторые этапы гистологического исследования были выполнены в ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Срезы фотографировали в ресурсном центре «Хромас» СПбГУ. Несмотря на принципиальное сходство в организации ЖСС у названных видов отмечены вариации, в т.ч. в пределах одного рода, в общей форме ЖСС, в специфике ядер и структуры цитоплазмы. Для ЖСС представителей всех изученных нами видов характерна функциональная регионализация, проявляющаяся, в том числе, в различной интенсивности процессов ассимиляции желтка в разных областях, о чем можно судить по количеству желточных включений, густоте расположения микроворсинок ЖСС (*D. rerio),* а также вакуолизации передней, задней и дорсальной областей ЖСС (*C. carpio koi)*. В ЖСС сиговых своей структурой отличаются зоны цитоплазмы, окружающие жировую каплю и желток. В первом случае цитоплазма выглядит исчерченной, во втором - различима апико-базальная зональность. Между жировой каплей и массой желтка есть цитоплазматическая прослойка, которая на исследованных нами стадиях оставалась незамкнутой. Толщина ЖСС вдоль дорсовентральной и переднезадней оси неодинакова на каждой исследованной стадии

и меняется в ходе развития. Дорсомедиальная область ЖСС личинок всех исследованных нами видов тоньше остальных его участков. Также для личинок всех этих видов характерны увеличенные дорсолатеральные области ЖСС, причем эта особенность выражена в наибольшей степени у сиговых. Ядра ЖСС разнообразны по размеру и форме. В ЖСС *C. carpio koi, M. fossilis* и сиговых встречаются ядра, соединенные между собой мостиками. Для ЖСС представителей всех названных видов характерны как очень светлые ядра с сетчатой организацией хроматина, так и ядра, содержащие большее количество гетерохроматиновых гранул. Следует отметить исключительную сложность форм ядер ЖСС сиговых. Наименее сложной оказывается структура ЖСС *D. rerio*, развивающихся при относительно высоких температурах и имеющих самые мелкие яйца без жировой капли. Самая сложная организация ЖСС характерна для сиговых с их продолжительным развитием при низких температурах и крупными олигоплазматическими яйцами с жировой каплей.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 16-34-00391).

ЭКСПРЕССИЯ КОЛЛАГЕНА II ТИПА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ММСК КОСТНОГО МОЗГА НА ПОЛИЛАКТИДНЫХ ПЛЕНКАХ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ

© *П.В. Копелев,[1,2] Ю.А. Нащекина,[1,2] С.А. Александрова.[1]* [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург
paxa94@bk.ru

Поли(L,L-лактид) является одним из перспективных материалов для тканевой инженерии хряща. Можно предположить, что низкоадгезивные свойства его поверхности, а также наличие хондроитинсульфата (ХС), могут способствовать хондрогенной дифференцировке стволовых клеток. Целью настоящей работы являлось исследование динамики роста мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга кролика и характера экспрессии ими коллагена II типа, являющегося основным белком хрящевой ткани, на полилактидных пленках (ПП) в разных условиях. ММСК 4-го пассажа культивировали на ПП, модифицированных ХС (1 г/мл), в ростовой или хондрогенной среде в течение 21 сут. Для выявления синтезированного клетками коллагена II типа плёнки с клетками окрашивали моноклональными антителами против коллагена II типа. Анализ проводили с использованием лазерного сканирующего микроскопа LSM 5 Pascal. Было выявлено, что при культивировании на ПП, модифицированных ХС, ММСК компактизовались и формировали крупные округлые скопления. У индуцированных ММСК наблюдали более компактные скопления. Экспрессия коллагена II типа была хорошо выражена в межклеточном матриксе скоплений и усиливалась при культивировании на ПП с ХС. Можно заключить, что на полилактидных пленках, модифицированных хондроитинсульфатом, ускоряется процесс хондрогенной дифференцировки ММСК.

НАРУШЕНИЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ПРИ ОБРАБОТКЕ АНТИОКСИДАНТАМИ.

© *Ю.С. Корниенко,[1,2] О.Г. Люблинская,[1] И.С. Смирнова,[1] Н.А. Пуговкина,[1] В.В. Зенин,[1] Н.Н. Никольксий.[1]* [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [2]Кафедра Биофизики СПбПУ Петра Великого, Санкт-Петербург, yulya.kornienko.95@mail.ru

Известно, что повышенный уровень внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) вызывает повреждение молекулярного пула клетки, что может приводить к преждевременному старению или клеточной гибели. Соответственно, предполагается, что антиоксиданты оказывают исключительно благотворное воздействие на различные типы клеток и на весь организм в целом. В то время как положительный эффект от применения антиоксидантов в случаях окислительного стресса, вызванного в клетках внешними воздействиями или внутренними патологиями, доказан, мало кто задумывается о возможном негативном влиянии антиоксидантов на здоровые клетки организма, поддерживающие физиологически-релевантный уровень АФК.

Антиоксиданты, попадая в здоровые клетки, нарушают их внутриклеточный редокс-баланс, что может приводить к нарушению регуляции АФК-зависимых сигнальных каскадов в клетках. В данной работе исследовалось влияние высоких доз антиоксидантов (темпол, ресвератрол, DPI, апоцинин) на динамику пролиферации мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека (МСКэ). Культуры МСКэ, выделенные из дескамированного эндометрия здоровых доноров (Земелько и др., 2011), были синхронизированы по фазам клеточного цикла бессывороточным голоданием. Обработка антиоксидантами осуществлялась спустя 14 часов после активации пролиферации, на стадии ранней S-фазы клеточного цикла МСКэ. Динамика клеточного цикла анализировалась в течение 48 часов после активации пролиферации методом проточной цитометрии. Показано, что обработка антиоксидантами вызывает дозо-зависимое замедление фазы синтеза ДНК и блок клеточного цикла в G_2/M-фазе. Анализ накопления маркеров разрывов ДНК – фосфорилированной модификации гистона H2AX и активной ATM-киназы (ataxia telangiectasia mutated kinase) – показал, что блок клеточного цикла в G2/M-фазе при обработке МСКэ антиоксидантами обусловлен ATM-опосредованным ответом на повреждения ДНК. Кроме того, установлено, что замедление протекания фазы синтеза ДНК под действием антиоксидантов сопровождается понижением уровня циклина А – одного из ключевых белков, регулирующих клеточный цикл на стадии синтеза ДНК. Таким образом, в работе показано, что высокие дозы антиоксидантов оказывают стрессовое воздействие на культуры МСКэ, вызывая остановку пролиферации, обусловленную генотоксическим стрессом и нарушением регуляции клеточного цикла.

Работа поддержана грантом РНФ №14-50-00068.

РАЗРАБОТКА НОВОЙ МОДЕЛИ ПСОРИАЗОПОДОБНОГО ДЕРМАТИТА У МЫШЕЙ ПРИ ВНУТРИКОЖНОМ ВВЕДЕНИИ РЕКОМБИНАНТНОГО IL-36γ ЧЕЛОВЕКА.

© *Д. А. Корсун, Т. А. Сазонова,* ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, korsundaria@mail.ru.

Псориаз – хроническое аутоиммунное заболевание, которым страдает почти 3% населения Земли. Механизмы развития псориаза до конца не изучены, а существующие на сегодняшний день терапевтические подходы не позволяют добиться полного излечения пациента, поэтому так важно изучение механизмов патогенеза псориаза и разработка новых средств его терапии. На данный момент известно, что цитокины группы интерлейкина-36 (IL-36α, IL-36β, IL-36γ) играют важную роль в развитии псориаза у людей, а их внутрикожное введение может вызвать псориазоподобное поражение у экспериментальных животных. В данной работе впервые была разработана модель псориазоподобного дерматита у мышей при ежедневном внутрикожном введении рекомбинантного IL-36γ человека. Мы показали, что введение IL-36γ вызывает выраженное утолщение кожной складки, увеличение индекса PASI кожи, в месте введения препарата начиная с 24 часов после первого введения и в течение всего эксперимента. Гистологическое исследование выявило развитие акантоза, паракератоза и гиперкератоза – признаков, характерных для псориатического поражения кожи. ПЦР-РВ показал, что через 48 часов после первого введения IL-36γ в коже наблюдается тенденция к возрастанию уровней провоспалительных цитокинов TNFα, IL-6, IL-36α. Возможная близость развития псориазоподобного поражения у мышей к вероятным механизмам развития псориаза у людей позволит использовать данную модель для тестирования новых противопсориатических препаратов.

ПОДАВЛЕНИЕ RAS/RAF/MEK/ERK-ПУТИ ПРИВОДИТ К АПОПТОЗУ *RAS*-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК, ПРЕТЕРПЕВАЮЩИХ HDACI-ИНДУЦИРОВАННОЕ СТАРЕНИЕ.

© *Кочеткова Е.Ю*[1]*., Блинова Г.И*[1]*., Зубова С.Г*[1]*., Быкова Т.В*[12]*., Поспелова Т.В*[1]. [1]Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург lena.linnaea@gmail.com
[2]Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург.

Малая ГТФ-аза *Ras* относится к числу наиболее часто мутирующих протоонкогенов, которые выявляются примерно в 30% опухолей. Ингибиторы Ras/Raf/MEK/ERK-пути активно изучаются как агенты, способные селективно элиминировать *Ras*-трансформированные клетки. Не менее актуальными в рамках разработки новых стратегий противоопухолевой терапии являются исследования аутофагии, поскольку этот клеточный процесс является важным для выживания опухолевых клеток, особенно *Ras*-трансформированных. Целью данной работы было изучение роли MEK/ERK пути в регуляции аутофагии в *Ras*-трансформированных интактных клетках и клетках, претерпевающих процесс индуцированного старение. Роль MEK/ERK-пути исследовалась с помощью специфического ингибитора PD0325901 (PD). Старение индуцировалось ингибитором деацетилаз гистонов бутиратом натрия (NaBut).

Согласно данным анализа маркеров аутофагии, NaBut и PD индуцируют разные типы аутофагии. Бутират-индуцированная аутофагия характеризуется накоплением белка-маркера аутофагии LC3, низкой интенсивностью конверсии цитоплазматической формы LC3I в мембран-ассоциированную LC3II, не завершается слиянием аутофагосом с лизосомами. Согласно данным по накоплению белка p62/SQSTM1, деградация которого является признаком завершения аутофагического процесса, NaBut-индуцированная аутофагия не связана с деградацией содержимого аутофагосом, а служит для поддержания гипертрофного, гиперсекреторного фенотипа. При действии PD уже через 24ч действия ингибитора выявлена апоптотическая гибель. Однако согласно данным оценки жизнеспособности методом МТТ-теста, пролиферативной активности и клоногенной выживаемости, через 72-120 часов клетки восстанавливают жизнеспособность и пролиферативную активность благодаря активации цитопротективной аутофагии. В том случае, когда клетки культивировали с PD+NaBut совместно, в стареющих клетках активируется цитотоксическая аутофагия, приводящая к массовой апоптотической гибели клеток. Согласно полученным данным, к гибели клеток при совместном действии PD+NaBut приводит не только переключение аутофагии с цитопротективной на цитотоксическую, но и деградациия онкогенного *Ras*. Как показал иммунофлуоресцентный анализ, при культивировании клеток с PD+NaBut совместно, через 24 и 72 часа *Ras* выявляется в аутофагосомах, исчезая из подмембранного пространства, в котором локализуется в норме, и по данным вестерн-блоттинга содержание его уменьшается. Таким образом, полученные данные позволяют говорить о том, что Ras/Raf/MEK/ERK-путь вовлечен в поддержание жизнеспособности *Ras*-трансформированных клеток путем регуляции цитопротективной аутофагии, а в стареющих *Ras*-трансформатах подавление активности Ras пути является причиной активации массовой апопотической гибели.

СВЯЗЬ БЕЛКА EEA1 С МЕМБРАНАМИ ЭНДОСОМ СТАБИЛИЗИРУЕТСЯ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ЭНДОЦИТОЗА РЕЦЕПТОРА ЭФР.

© В. В. Кошеверова, Р. С. Каменцева, М. В. Харченко, Е. С. Корнилова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vera77867@mail.ru.

В последние годы стало понятно, что фактор дистанционного взаимодействия EEA1 (аутоантиген ранних эндосом) располагается преимущественно на мембранах везикул в клетках вне зависимости от стимуляции в них эндоцитоза. Однако вопрос о том, изменяется ли динамика связывания EEA1 с везикулами при стимуляции эндоцитоза, остается открытым. Методом FRAP (восстановления флюоресценции после фотовыжигания) в

клетках HeLa, трансфицированных плазмидой, кодирующей EEA1-EGFP, оценивали связывание белка EEA1 с мембранами везикул в клетках, культивируемых 12 ч в условиях дефицита сывороточных факторов (контроль), с последующей стимуляцией в них эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Выявлены две фракции: быстро и медленно обменивающиеся с цитоплазмой. При запуске эндоцитоза появляется имммобильная фракция ассоциированного с мембранами EEA1 и увеличивается время полувосстановления флуоресценции для медленной кинетической компоненты. Таким образом, стимуляция эндоцитоза РЭФР приводит к стабилизации ассоциации части EEA1 с мембраной эндосом.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00068) и при финансовой поддержке ФАНО с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

ТРЕХМЕРНАЯ АРХИТЕКТУРА ГЕНОМА И ЛОКУС-СПЕЦИФИЧНЫЕ ДОМЕНЫ В КЛЕТОЧНОМ ЯДРЕ.

© *А.В. Красикова*[1], *А.В. Маслова*[1], *В.С. Фишман*[2,3], *Н.Р. Баттулин*[2,3], *О.Л. Серов*[2,3], *А.М. Злотина*[1], *Н. Косякова*[4], *Т. Лир*[4], *Д.В. Дедух*[1], *Д.А. Червякова*[1], *Т.В. Куликова*[1].
[1]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия, alla.krasikova@gmail.com
[2]Институт цитологии и генетики, Новосибирская область, Россия; [3]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия; Институт генетики человека, Университет им. Ф. Шиллера, Йена, Германия.

Пространственная архитектура генома, как на уровне организации хромосомных территорий, так и на уровне формирования комплексных доменов хроматина играет решающую роль в регуляции экспрессии генов. В настоящей работе мы провели сравнительный анализ архитектуры генома в интерфазном ядре соматической клетки и в ядре растущего ооцита на примере домашней курицы. Домашняя курица представляет собой удобный модельный объект биологии развития, цитогенетики, вирусологии и биомедицины. Геном курицы был первым расшифрованным геномом представителей класса Птицы. Кроме того, для домашней курицы продемонстрировано радиальное пространственное распределение хромосомных территорий в интерфазном ядре, известен спектр тандемно повторяющихся последовательностей, подробно описан кариотип, представленный макро- и микрохромосомами.

Полученные результаты показали существенные отличия и одновременно определенные закономерности в организации генома в интерфазном ядре и в ядре растущего ооцита. Отличия пространственной организации генома в интерфазном ядре состоят в упорядоченной радиальной организации территорий обогащенных и обедненных генами хромосом, которая обусловлена формированием хромоцентров, объединяющих центромерные районы микрохромосом в центре ядра, и периферийного гетерохроматина, в котором заякорены центромерные районы макрохромосом. Напротив, для гигантских ядер растущих ооцитов характерно отсутствие радиальной организации макро- и микрохромосом, хромоцентров и периферийного гетерохроматина, при этом поддержание хромосом и ядерных телец в пространстве ядра обеспечивается формированием так называемого «золя», состоящего из динамичных олигомеров ядерного актина.

На уровне отдельных хромосомных доменов, мы впервые представляем результаты расшифровки пространственной карты генома домашней курицы, полученные с помощью технологии фиксации и высокопродуктивного анализа конформации хромосом (Hi-C). Полученная карта пространственных контактов генома в эритроцитах и эмбриональных фибробластах домашней курицы показала типичное строение, ранее выявленное для млекопитающих и насекомых. В обоих типах клеток идентифицированы топологически ассоциированные домены (TADs), A- и B-компартменты со сходной локализацией приграничных районов. Одновременно мы расшифровали геномный состав ряда механически диссектированных структурных элементов гигантских хромосом

типа ламповых щеток, характерных для ядер растущих ооцитов. Мы полагаем, что минимальная структурная единица хромосомы типа ламповых щеток – хромомер размером 2-4 млн.п.н. – соответствует одному или нескольким сгруппированным топологически ассоциированным доменам (TADs) интерфазных хромосом.

Мы также приводим две взаимодополняющие стратегии для определения локусов и механизма формирования ядерных доменов, ассоциированных с хромосомами (подобных тельцам гистонового локуса и ядрышкам). Эти стратегии включают: (1) последовательное картирование BAC-клонов на хромосомах типа ламповых щеток недалеко от района формирования ядерного тельца с целью сужения участка генома при дальнейшем биоинформатическом анализе; (2) механическую микродиссекцию участка хромосомы, отвечающего за формирование ядерного домена, с последующим секвенированием диссектированной ДНК с помощью высокопроизводительных технологий и биоинформатическим анализом. Полученные результаты показывают, что существенную роль в формировании ассоциированных с хромосомами ядерных доменов играют так называемые «архитектурные РНК», принадлежащие новому классу регуляторных некодирующих белки РНК.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00131). Часть исследований выполнена при технической поддержке ресурсных центров СПбГУ «Хромас», «Обсерватория экологической безопасности», «Биобанк» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

СНИЖЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ОКТАЭДРИЧЕСКИХ КЛАСТЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ РЕНИЯ И МОЛИБДЕНА ПУТЕМ ИХ КОНЪЮГАЦИИ С БИОПОЛИМЕРАМИ.

© *А.А. Красильникова,[1,2] А.А. Иванов,[1,3] Ю.А. Воротников,[3] О.Г. Курская,[1] М.А. Шестопалов.[1,2,3]*

[1] Институт экспериментальной и клинической медицины, Новосибирск, [2]Институт клинической и экспериментальной лимфологии, Новосибирск, [3]Институт неорганической химии им. А.В. Николаева, Новосибирск

kras-a90@mail.ru

Октаэдрические кластерные комплексы рения $[\{Re_6Q_8\}L_6]^{4-}$ (где Q – внутренний лиганд, представленный S, Se или Te, L — внешний органический или неорганический лиганд) и молибдена $[\{Mo_6X_8\}X_6]^{2-}$ (X = Cl, Br или I) способны поглощать рентгеновское излучение и люминесцировать в УФ-свете, а также генерировать синглетный кислород под действием УФ-излучения. Благодаря этим свойствам данные соединения обладают широким потенциалом применения во многих областях биологии и медицины. Однако для внедрения данных соединений в клиническую практику требуется детальное исследование их токсичности, а также достижение максимально возможной степени их безопасности для живых организмов.

Результаты нашей работы показали, что такие комплексы как $Na_4[\{Re_6Te_8\}(CN)_6]$ и $Na_2H_8[\{Re_6Se_8\}(P(C_2H_4CONH_2)(C_2H_4COO)_2)_6]$ демонстрируют достаточно высокую степень безопасности при внутривенном введении (LD_{50} равно 1.1 и 4.7 г/кг соответственно). Однако даже таких высоких значений полулетальной дозы недостаточно для применения данных соединений в качестве рентгеноконтрастных агентов. В связи с этим, актуальной задачей является снижение токсичности октаэдрических кластерных комплексов рения.

В качестве агентов, которые потенциально могут снизить токсичность кластерных комплексов, были выбраны такие биополимеры как полиэтилен гликоль (PEG4 и PEG 40) и декстран 70, (DEX70) и их окисленные формы (PEG4.ox, PEG40.ox, DEX70.4%, DEX70.30%). Результаты исследования цитотоксичности, проведенные на культуре клеток HeLa (МТТ-тест), показали, что добавление к раствору комплекса PEG4.ox достоверно снижает токсичность $K_4[\{Re_6Se_8\}(OH)_6]$ и $Na_2H_8[\{Re_6S_8\}(PL_3)_6]$, где L = $C_2H_4COO^-$. Добавление PEG40.ox достоверно снижает токсичность $Na_2H_8[\{Re_6S_8\}(PL_3)_6]$, а добавление DEX70.4% и DEX70.30%

достоверно снижает токсичность $K_4[\{Re_6Se_8\}(OH)_6]$.

Кроме того, было выявлено, что конъюгация с биополимерами переводит изначально водонерастворимый комплекс $(Bu_4N)_2[\{Mo_6I_8\}(NO_3)_6]$ в растворимое состояние. В связи с чем, данный комплекс также становится возможным рассматривать в качестве потенциального агента для рентгеноконтрастной диагностики. Конъюгаты $\{Mo_6I_8\}$@DEX70, {Mo6I8}@DEX70.4% и $\{Mo_6I_8\}$@DEX70.30% хорошо переносятся животными при внутривенном введении в дозе 3 г/кг.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант №15-15-10006)

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ И МЕХАНИЗМОВ СИНТЕЗА NAD ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В КУЛЬТИВИРУ-ЕМЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА.

© *В.А. Куликова[1,2], К.А. Шабалин[2,3], Д.В. Фирсанов[2], М.П. Светлова[2], А.П. Якимов[1,3], К.Б. Нериновский[1,4], М.А. Ходорковский[1], М. Циглер[5], А.А. Никифоров[1,2]*. [1]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, veronika.livinskaya@gmail.com
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, [3]Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, [4]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, [5]Университет Бергена, Департамент молекулярной биологии, Берген, Норвегия.

Никотинамид аденин динуклеотид (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) является кофактором окислительно-восстановительных реакций ключевых метаболических путей. Кроме того, расщепление NAD на никотинамид (Nam) и АДФ-рибозу необходимо для таких важнейших регуляторных модификаций как деацетилирование, а также моно- и поли-АДФ-рибозилирование белков. Данные NAD-зависимые посттрансляционные модификации белков регулируют такие жизненно важные процессы, как экспрессия генов, репарация ДНК, апоптоз, старение и многие другие. Для эффективного осуществления NAD-зависимых метаболических и сигнальных функций клетке необходимо постоянно поддерживать определенный уровень NAD.

Основным способом поддержания уровня NAD в клетках человека является его биосинтез из поступающих с пищей предшественников, таких как Nam, никотиновая кислота (NA) и рибозиды никотинамида (NR) и никотиновой кислоты (NAR). К настоящему моменту установлено, что внеклеточные нуклеотиды NMN (NAMN) и NAD (NAAD) также способны эффективно поддерживать внутриклеточный пул NAD. Каким образом это происходит, на данный момент до конца не выяснено.

Настоящая работа направлена на изучение эффективности и механизмов действия внеклеточных предшественников синтеза NAD в культивируемых клетках человека. Для этого нами был разработан метод детекции NAD и его основных метаболитов в различных биологических образцах при помощи ЯМР. Данный метод позволяет проводить количественный анализ Nam, NA, NR, NAR, NMN, NAMN, NAAD и NAD в кондиционированной питательной среде и экстрактах клеток человека.

Изучаемые метаболиты добавляли к клеткам линии HEK 293, после чего кондиционированную питательную среду анализировали с помощью ЯМР. Мы показали, что динуклеотиды NAD и NAAD, добавленные к клеткам HEK 293, расщепляются до мононуклеотидов NMN и NAMN, а NMN дефосфорилируется до NR, который потом входит в клетку и используется там для синтеза NAD.

Для того чтобы оценить эффективность различных внеклеточных предшественников для синтеза внутриклеточного NAD, метаболиты NA, NR, NAR или NMN добавляли к клеткам линии HEK 293, после чего экстракты клеток анализировали с помощью ЯМР. Мы показали, что NAR является наиболее эффективным предшественником, в то время как NMN хуже всего поддерживает синтез внутриклеточного NAD.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 16-14-10240.

ЛЕЧЕНИЕ КРЫС С НЕОНАТАЛЬНОЙ МОДЕЛЬЮ ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА МЕТФОРМИНОМ ВОССТАНАВЛИВАЕТ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ИНСУЛИНУ.

© *А. А. Куликова, Д. М. Бузанаков, К. В. Деркач, В. М. Бондарева, А. О. Шпаков.* Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, kulikova9404@gmail.com.

Преимуществами метформина (МФ), основного препарата для лечения сахарного диабета 2-го типа (СД2), являются его способность улучшать гликемический контроль и отсутствие гипогликемических эпизодов при его применении. Однако терапевтический потенциал МФ при лечении тяжелых форм СД2 с нарушенной функций поджелудочной железы мало изучен. Целью работы было исследовать влияние двухмесячной терапии МФ самцов крыс с неонатальной моделью СД2 на их метаболические показатели и инсулиновую резистентность. Неонатальная модель СД2, которую вызывали обработкой пятисуточных крысят стрептозотоцином, характеризуется инсулиновой резистентностью и сниженной продукцией инсулина β-клетками. В возрасте 3 мес у животных отмечали признаки СД2 – гипергликемию, снижение чувствительности к инсулину, триглицеридемию. В возрасте 4 мес часть диабетических животных стала получать МФ (перорально, 200 мг/кг/день/сутки, 2 мес) (Д+МФ, n=6). Оставшиеся диабетические крысы (Д, n=6) и контроль (К, n=6) получали плацебо. С помощью глюкозотолерантного теста в группе Д+МФ было выявлено частичное восстановление толерантности к глюкозе, на что указывает снижение уровня глюкозы через 120 мин после нагрузки (8.1±1.5 мМ в группе Д+МФ против 12.1±1.9 мМ в группе Д, P<0.05). В группе Д+МФ снижался уровень глюкозы натощак в сравнении с группой Д (4.7±0.4 против 6.1±0.6 мМ, P<0.05). С помощью инсулиноглюкозотолерантного теста установлено, что лечение МФ повышает чувствительность тканей к инсулину. В группе Д+МФ отмечали нормализацию показателей липидограммы. Таким образом, лечение МФ может быть эффективным при тяжелых, декомпенсированных формах СД2.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (проект 14-15-00413).

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ-36 В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КЕРАТИНОЦИТОВ МЫШИ.

© *Ладыгина М. Д.* [1,2] [1]Гос НИИ ОЧБ, Санкт-Петербург, Россия, [2]Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия miunfi@gmail.com.

Интерлейкин-36γ (IL-36 γ) и рецепторный антагонист интерлейкина-36 (IL-36Ra) – представители семейства цитокинов интерлейкина-1. Установлено наличие связи между нарушением экспрессии генов белков IL-36γ и IL-36Ra и хроническими воспалительными процессами в эпителиальных тканях. В то же время остается невыясненным значение цитокинов семейства IL-36 как факторов активации кератиноцитов при хронических воспалительных заболеваниях, таких как псориаз.

На данный момент проводится исследование механизма функционирования цитокинов этой группы в процессе воспаления в коже в модельных системах in vitro и in vivo, их биологической активности и вовлеченности в цитокиновую сеть клеток эпидермиса. Модель in vitro представляет собой клетки первичной культуры мышиных кератиноцитов, выращенных на коллагеновом геле, и клетки первичной культуры кератиноцитов, выращенных на дермальном эквиваленте, формирующемся из коллагенового геля путем смешивания раствора коллагена I типа и фибробластов.

Таким образом, создание модели in vitro для изучения биологической активности IL-36γ и IL-36Ra дает возможность изучить действие этих цитокинов на различные типы клеток, механизмы взаимодействия с другими цитокинами - инициаторами воспаления.

РАЗЛИЧИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ БЫСТРЫХ И МЕДЛЕННЫХ ЛЮЦИФЕРАЗ.

© А. *Е. Лисица,*[1] *Е. В. Немцева,*[2] *А. А. Деева,*[1] *В. А. Кратасюк.*[1,2] [1]Сибирский федеральный университет, Красноярск, AlbertFox91@gmai.com,
[2]Институт биофизики СО РАН, Красноярск.

Бактериальные люциферазы катализируют реакцию окисления восстановленного флавинмононуклеотида в присутствии длинноцепочного алифатического альдегида. Их уникальным свойством, по сравнению с другими флавин-зависимыми оксигеназами, является образование возбужденного интермедиата, дезактивация которого приводит к излучению света в видимом диапазоне (~490 нм). Люциферазы разных бактерий – высоко гомологичные белки, при этом по характеристикам кинетики их разделяют на две группы – «быстрые» (из рода *Photobacterium, Aliivibrio* и др.) и «медленные» (из рода *Vibrio, Photornabdus* и др.). Целью данной работы было установить стадии биолюминесцентной реакции, определяющие различия в кинетике быстрых и медленных бактериальных люцифераз.

Изучение нестационарной кинетики проводили методом остановленного потока с помощью анализатора SX-20 (Applied Photophysics) регистрируя интенсивность свечения или поглощение при 380 и 445 нм. Для определения констант скоростей отдельных стадий кинетические кривые моделировали в программных пакетах OriginPro и SciLab.

Проведено сопоставление констант скоростей, полученных для люциферазы *Photobacterium leiognathi,* с опубликованными ранее значениями для фермента *Vibrio harveyi*. Показано, что различие в кинетических механизмах быстрых и медленных люцифераз реализуется за счет процессов связывания альдегида и его окисления до карбоновой кислоты. Установлено, что скорости образования комплекса фермента с 4а-гидропероксифлавином и его темнового распада схожи для двух типов люцифераз. Проанализированы структурные особенности активных центров двух типов люцифераз, оказывающие влияние на стабилизацию интермедиатов.

ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЛИЯНИЯ АНТИТЕЛ, ВЫРАБОТАННЫХ НА ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ УЧАСТКИ МК4- И МК3-МЕЛАНОКОРТИНОВЫХ И 1В-СЕРОТОНИНОВОГО РЕЦЕПТОРОВ, НА АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ В ГИПОТАЛАМУСЕ.

© *А. А. Ложков, К. В. Деркач, О. А. Жарова, А. О. Шпаков.* Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, aswert6@mail.ru.

Выключение $МК_3$- и $МК_4$-меланокортиновых ($МК_3Р$, $МК_4Р$) и 5-$НТ_{1В}$-серотонинового рецепторов (5-$НТ_{1В}Р$) с помощью иммунизации (восьмикратно, 12 месяцев) крыс пептидами, соответствующими внеклеточным участкам этих рецепторов (269-280 $МК_3Р$, 11-25 $МК_4Р$, 189–205 5-$НТ_{1В}Р$), вызывает метаболические и гормональные нарушения, негативно влияет на активность гормональных систем в ЦНС и на периферии. Цель работы – оценить специфичность ингибирующего влияния выработанных в ходе такой иммунизации антител на чувствительность гипоталамической аденилатциклазной системы к агонистам $МК_3Р$, $МК_4Р$ и 5-$НТ_{1В}Р$. Выделение антител проводили последовательной обработкой сывороток крови каприловой кислотой и сульфатом аммония, активность антител контролировали с помощью ИФА. В качестве контроля использовали сыворотку здоровых животных. В присутствии антител, выделенных из крови иммунизированных крыс, базальная активность аденилатциклазы (АЦ) не менялась (анти-5-$НТ_{1В}Р$) или снижалась (анти-$МК_3Р$ и анти-$МК_4Р$). Анти-$МК_4Р$ антитела снижали стимулирующие АЦ эффекты агонистов $МК_4Р$ и повышали значения $ЕС_{50}$ для их эффектов. Анти-$МК_3Р$ антитела снижали стимулирующий АЦ эффект $МК_3Р$-агониста γ-МСГ. Стимулирующие эффекты гормонов, действующих через другие типы рецепторов, при этом не менялись. Анти-5-$НТ_{1В}Р$ антитела ослабляли ингибирующие АЦ эффекты 5-$НТ_{1В}Р$-агонистов и, в меньшей степени, 5-$НТ_{1А}Р$-агонистов. Таким образом, антитела, выработанные к внеклеточным участкам $МК_3Р$, $МК_4Р$ и 5-$НТ_{1В}Р$, блокируют, хотя и с различной степенью специфичности, передачу гормонального сигнала через эти

рецепторы и могут быть отнесены к классу ингибирующих антител.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (проект 14-15-00413).

ТРЕХПЕТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА LY-6/UPAR: ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ МНОГООБРАЗИЕ В РАМКАХ ОДНОГО СТРУКТУРНОГО МОТИВА.

© *Е. Н. Люкманова, М. А. Шулепко, Д. С. Кульбацкий, М. Л. Бычков, Н. А. Васильева, Е. В. Локтюшов, А. А. Бойко, А. В. Феофанов, З. О. Шенкарев, Д. А. Долгих, М. П. Кирпичников.* Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, ekaterina-lyukmanova@yandex.ru.

Открытие у высших животных белков семейства Ly-6/uPAR, имеющих гомологичную структуру с альфа-нейротоксинами яда змей, вызвало огромный интерес к этим молекулам и их роли в работе организма. Эти белки (> 30 представителей) были обнаружены как в центральной нервной системе, так и в иммунной, эндокринной и репродуктивной системах человека. Известно, что существует два типа белков семейства Ly-6/uPAR: ассоциированные с клеточной мембраной и секретируемые. О механизмах действия этих белков в настоящее время известно немного. Для некоторых из них (Lynx1, SLURP-1, SLURP-2, Lypd6), также как и для альфа-нейротоксинов яда змей, мишенью действия является никотиновый ацетилхолиновый рецептор, который широко представлен как в центральной и периферической нервной системе, так и во многих других тканях человека, включая клетки эпителия и иммунной системы. Наиболее изученным белком этого семейства является мембраносвязанный нейромодулятор Lynx1. На данный момент Lynx1 рассматривается как один из ключевых факторов, участвующих в регуляции когнитивных процессов. Секретируемые SLURP-1 и SLURP-2 рассматриваются как ауто/паракринные гормоны эпителиальных клеток, контролирующие пролиферацию, дифференцировку и злокачественную трансформацию клеток. Мембраносвязанный белок Lypd6 участвует в процессах эмбриогенеза, регулируя Wnt/бета-катениновый каскад путем взаимодействия с рецепторным комплексом Wnt. Однако, для большинства белков семейства Ly-6/uPAR мишени и механизм действия остаются неизвестными.

В докладе представлены последние данные о структурно-функциональных исследованиях белков семейства Ly-6/uPAR, выявляющие схожесть и отличия их свойств как между собой, так и в сравнении с гомологичными трехпетельными α-нейротоксинами змей. Впервые на ряде раковых линий эпителиального происхождения показана антипролиферативная активность SLURP-1 и SLURP-2. Высокая эффективность действия SLURP-1 и SLURP-2 указывает на перспективность использования этих природных пептидов в медицинских целях. Впервые показано, что Lynx1 конкурирует с бета-амилоидным пептидом за связывание с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами и, возможно, является, природным «защитником» от болезни Альцгеймера. Взаимодействие Lynx1, Lypd6 и Lypd6b с субъединицами GABA-рецепторов, выделенными из мозга крысы, указывает на новую мишень действия этих трехпетельных белков, играющую важную роль в развитии когнитивных функций.

Работа поддержана РНФ (№ 16-14-00102, функциональные исследования Lynx1, Lypd6 и Lypd6b) и РФФИ (№№ 15-04-99517 и 16-04-01697).

ЧАСТОТА И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ САЙТОВ РЕКОМБИНАЦИИ В ГЕНОМАХ *RIPARIA RIPARIA* И *HIRUNDO RUSTICA*.

© *Л. П. Малиновская.* Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, wh.serpent@gmail.com.

Мейотическая рекомбинация – ключевой процесс полового размножения, обеспечивающий генетическое разнообразие особей в популяции и материал для естественного отбора. Мы изучали рекомбинационные характеристики у двух видов птиц – ласточки-береговушки (*Riparia riparia*) и деревенской ласточки (*Hirundo*

rustica). Мы использовали метод иммуноокрашивания мейотических белков: SYCP3, входящего в состав синаптонемного комплекса (СК), MLH1 – белка мис-матч репарации, входящего в состав поздних рекомбинационных узелков и маркирующего сайты рекомбинации, и белков центромеры. Среднее число сигналов MLH1 достоверно различалось между *R. riparia* и *H. rustica* и составило 46,8±3,2 и 54,9±5,7. Картина распределения сигналов MLH1 вдоль аутосом соответствовала наблюдаемой в других организмах: выраженный рекомбинационный пик вблизи теломер и низкая частота (или отсутствие) рекомбинации около центромеры. Гетероморфные половые хромосомы Z и W рекомбинировали в районе инициации синапсиса вблизи теломер, затем в ходе синаптической подгонки происходила их эквиализация. У ласточки-береговушки мы обнаружили добавочную акроцентрическую хромосому, ограниченную клетками зародышевого пути. Подобная хромосома была нами найдена также у близкородственного вида: бледной ласточки (*Riparia diluta).*

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-04-08389)

ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ МОНОЦИТОВ THP-1 И РАКОВЫХ КЛЕТОК A431 ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ.

© *Л.В. Марченко,[1,2] И.В. Гужова.[1]*. [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [2] Биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета
lelkavl@mail.ru.

Микроокружение опухоли отличается неоднородностью популяционного состава, многообразием синтезируемых продуктов и различной степенью влияния на рост опухоли. Опухолевые клетки секретируют хемоаттрактанты, рекрутирующие проинвазивные клетки воспаления. Одним из важнейших компонентов иммунного окружения опухоли являются макрофаги, которые под влиянием ракового «соседства» претерпевают переход к опухоль-ассоциированному фенотипу М2 и становятся опухоль-ассоциированными макрофагами (TAMs, tumor-associated macrophages). С того момента, как TAMs начинают продуцировать ФНО-β, они являются ключевыми координаторами ангиогенеза и метастазирования.

Полученные нами данные говорят о том, что совместное культивирование злокачественных клеток эпидермоидной карциномы человека А431 с клетками острой моноцитарной лейкемии человека THP-1 приводит к переходу моноцитов в опухоль-ассоциированный М-2 фенотип, а также к усилению агрессивных свойств опухолевых клеток, таких как повышение пролиферации последних, увеличение их миграционных свойств, повышение экспрессии маркеров метастазирования и ЭМП, падение уровня экспрессии Е-кадгерина. Наиболее интересный результат заключается в том, что мы показали, что в процессе совместного культивирования происходят волнообразные изменения как опухолевой популяции, так и популяции моноцитов.

РЕГУЛЯЦИЯ МЕСТНЫМИ АНЕСТЕТИКАМИ КАНАЛООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЦЕКТРОПИНА А.

© *Р. Я. Медведев, С. С. Ефимова*. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, gront92@gmail.com.

Молекулярные механизмы, ответственные за развитие местной анестезии, долгое время были объектом для дискуссии. Согласно современной концепции, обезболивание происходит в результате блокирования местными анестетиками (МА) потенциал-зависимых натриевых каналов нервных клеток [Sonner and Cantor, Annu. Rev. Biophys., 2013]. Однако этим действие МА не ограничивается, в литературе описан целый ряд потенциал- и лиганд-управляемых ионных каналов, на функционирование которых влияет введение МА [Scholz, Br. J. Anaesth., 2002]. При этом терапевтическая активность МА значительно зависит от гидрофобности молекулы [Meyer et al., Trans. Faraday Soc., 1937]. Более гидрофобные агенты обладают более длительным анестезирующим действием и выраженными побочными действиями. В этой связи становится актуальным вопрос о вовлеченности липидной мембраны в развитие

анестезии и побочных эффектов от МА. Изучение липидоопосредованного действия МА на ионные каналы удобно проводить с использованием модельных систем, таких как липосомы и плоские липидные бислои, что позволяет выделить ключевые моменты во взаимодействии агентов с мембраной и контролировать условия эксперимента. В работе было исследовано влияние нескольких МА, принадлежащих двум группам (амиды и сложные эфиры) на проницаемость липосом для кальцеина. Липосомы были сформированы из чистого диолеоилфосфохолина или 80 моль % диолеоилфосфохолина и 20 моль % кардиолипина. Предположение о липидоопосредованном действии МА на ионные каналы проверяли с помощью модели каналов, формируемых антимикробным пептидом цекропином А в плоских липидных бислоях. Известно, что характеристики одиночных цекропиновых каналов зависят от изменения физико-химических свойств мембраны при добавке низкомолекулярных амфифильных модуляторов [Christensen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988; Efimova et al., Langmuir, 2014].

В ходе работы показано, что среди изученных МА наибольшим влиянием на проницаемость липосом для кальцеина обладают тетракаин и бупивакаин. Диапазоны действующих концентраций этих анестетиков составляют 2 – 20 и 1 – 7 мМ, соответственно. Прокаин, бензокаин и лидокаин оказывают значительно меньшее влияние на утечку флуоресцентного маркера из липосом (не более 20 %). В результате изучения временной зависимости высвобождения кальцеина из везикул было установлено, что выраженность действия МА зависит от состава везикул. Целью следующего этапа было установление вовлеченности изменения вязкостных свойств мембраны под действием МА в регуляцию каналообразующей активности цекропина А. Выявлено, что введение бензокаина, бупивакаина и тетракаина до концентрации 1 мМ ингибирует мультиканальную активность пептида, тогда как лидокаин и прокаин практически не влияют на стационарную цекропин-индуцированную проводимость мембраны. Бензокаин, бупивакаин и тетракаин вызывают падение среднего тока, протекающего через одиночные цекропиновые каналы. Сопоставление полученных результатов влияния МА на проницаемость мембран и свойства каналов, образуемых цекропином А, позволило сделать заключение о липидоопосредованном действии МА на цекропиновые каналы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 15-34-20356.

СВЕРХЭКСПРЕССИЯ УБИКВИТИНЛИГАЗЫ PIRH2 СПОСОБСТВУЕТ ПОВЫШЕНИЮ ОНКОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК ЛИНИИ H1299.

© *В. О. Меркулов, А. А. Дакс, А. В. Петухов, О. А. Федорова, О. Ю. Шувалов, Е. А. Васильева и Н. А. Барлев*. Институт цитологии РАН
alexandra.daks@gmail.com.

Как известно, протеом клетки жестко регламентирован в соответствии с потребностями клетки. Патологическое изменение пула внутриклеточных белков является причиной многих заболеваний, в том числе онкологических.

Одной из главной систем поддерживающих протеомный гомеостаз внутри клетки является убиквитин-протеасомная система деградации белков. Белок Pirh2 – продукт гена *RCHY1* человека – относится к семейству RING-домен содержащих Е3-убиквитинлигаз. Среди мишеней Pirh2 необходимо выделить один из главных онкосупрессорных белков p53. Кроме того, мишенями убиквитинлигазы Pirh2 являются другие белки, участвующие в регуляции клеточного цикла, запуске апоптоза и ответе на повреждение ДНК, например, p63, Cdk9, p27. На сегодняшний день известно, что многие типы опухолей человека, такие как рак предстательной железы, рак легкого, гепатоклеточная карцинома и др., характеризуются повышенной экспрессией Pirh2.

Для того чтобы приблизиться к пониманию роли белка Pirh2 в процессе опухолеобразования, мы использовали клетки линии H1299 (немелкоклеточный рак легкого человека) со сверхэкспрессией Pirh2. Мы показали, что Pirh2 способствует повышению туморогенного потенциала клеток H1299 и их

устойчивости к химиотерапевтическому препарату доксорубицину.

Работа поддержана грантами РФФИ 16-34-00869 мол_а и 16-34-60228 мол_а_дк.

РОЛЬ МЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ В СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ - МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ I ТИПА: ВЗГЛЯД СО СТОРОНЫ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ.

© *К.С. Минеев*[1], *Э.В. Бочаров*[1], *П.Е. Брагин*[1], *К.Д. Надеждин*[1,2], *Е.В. Новикова*[1,2], *С.А. Гончарук*[1], *Гончарук М.В.*[1], *О.В. Бочарова*[1], *А.С. Арсеньев*[1,2]. [1]ФГБУ науки Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
mineev@nmr.ru
[2]Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва.

Мембранные белки I типа являются одним из наиболее интересных объектов структурной биологии. Данные белки содержат большие внутри- и внеклеточные домены, однако их трансмембранный (ТМ) домен состоит из одной α-спирали. Полноразмерные белки I типа не кристаллизуются, поэтому молекулярные механизмы активации для таких белков описаны на уровне пространственных структур отдельных доменов в различных состояниях. Для выявления взаимосвязи между состояниями отдельных доменов необходимо исследовать пространственную структуру связок из нескольких доменов рецепторов и такие работы в настоящий момент проводятся авторами на примере рецепторов семейств TLR, HER, TNFR. В частности, было изучено влияние цитоплазматических примембранных регионов рецептора TLR4 на структуру и способность к димеризации его ТМ доменов. Была получена пространственная структура белка HER2 в присутствии цитоплазматических примембранных регионов, что позволило предсказать конформацию ТМ домена в активном и неактивном состоянии полноразмерного рецептора. Была исследована структура и внутримолекулярная подвижность связки из ТМ и внутриклеточного доменов рецептора нейротрофинов p75. Полученные результаты позволили опровергнуть предложенный ранее механизм активации рецептора p75 и сформулировать новую гипотезу. Для проведения дальнейших исследований белковых конструкций, содержащих трансмембранный и внутриклеточный домены мембранных белков I типа были предложены и опробованы новые мембраноподобные среды, применимые для ЯМР-спектроскопии высокого разрешения.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-14-00573.

ДЕЙСТВИЕ КРАСНОГО ПИГМЕНТА ДРОЖЖЕЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ ПАТОГЕННЫХ АМИЛОИДОВ.

© *Е. В. Михайлова, П. А. Иванова, Ю. Э. Озерова*. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
4evamkh@gmail.com.

Формирование отложений неправильно уложенных белков, в особенности амилоидных отложений, характерно для ряда серьезных заболеваний. Среди лекарств наиболее перспективными считаются препараты, способные подавлять процесс накопления амилоидов в клетке, снижая количество амилоидов на стадии, наиболее токсичной для клеток. Настоящая работа посвящена изучению влияния красного пигмента дрожжей на амилоидизацию. В качестве модельного организма использовали дрожжи *S. cerevisiae* с клонированными в них пептидом бета и α-синуклеином, мечеными GFP. Ввиду консервативности основных метаболических путей в дрожжах белки подвергаются сходной агрегации, что позволяет моделировать некоторые аспекты болезней Альцгеймера и Паркинсона. Очищенный красный пигмент (1 мг/мл) добавляли в ростовую среду и индуцировали экспрессию патогенных белков. При помощи конфокальной микроскопии показали, что добавление красного пигмента заметно снижает количество образующихся агрегатов амилоида-бета. Вестерн-блот осадочной фракции клеточных лизатов, обогащенной амилоидами, подтвердил, что количество агрегатов Aβ-GFP действительно падает. Однако на клеточной гибели это никак

не сказывается, потому что Аβ не токсичен для клеток. Противоположная картина наблюдается при действии красного пигмента на α-синуклеин -- количество агрегатов заметно возрастает, но при этом значительно снижается токсичность включений – доля мертвых клеток в популяции составляет около 6 % вместо 20 % у клеток, растущих без красного пигмента. Подобные различия могут объясняться активацией собственных защитных механизмов клеток – олигомеры α-синуклеина более токсичны по сравнению с амилоидами.

Работа поддержана грантом президент РФ (№ МК-8111.2016.4).

ХАРАКТЕРИСТИКА МИГРАЦИОННОЙ И ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ СПОСОБНОСТИ МЕЗЕХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ХОДЕ ПАССИРОВАНИЯ В КУЛЬТУРЕ.

© *Н.Ф. Михеева,[1] Е.Н. Сушилова,[1] Н. Верещагина,[1] Н.С. Петров,[1] П.А. Бутылин,[2] А.Ю. Зарицкий,[2] Б.В. Попов.[1]* [1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, [2]Северо-Западный Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава РФ, Санкт-Петербург
borisvp478@gmail.com

Эпителиально-мезенхимный переход (ЭМП), представляющий собой высоко консервативную обратимую клеточную программу, в ходе которой неподвижные эпителиальные клетки теряют апикально-базальную полярность и превращаются в подвижные мезенхимные циркулирующие клетки, находится сейчас в фокусе исследовательского внимания (Thiery et al., 2009). ЭМП используется при формировании эмбриональных зачатков и отдельных органов в ходе внутриутробного развития, а после рождения – в формировании воспаления, заживления ран, в патологии – при инвазии и метастазировании опухолей. ЭМП регулируется специфическими транскрипционными факторами (ТФ-ЭМП) Snail, Zeb, Twist – высоко консервативными белками со структурой “цинковых пальцев”, которые могут напрямую связываться с промоторными участками генов-мишеней, например гена Е-кадхерина и подавлять его экспрессию. Целью настоящей работы была оценка пролиферативной и миграционной способности мезенхимных клеток (МСК) человека и соответствующих им эффекторных и регуляторных маркеров в ходе длительного пассирования в культуре. Мы обнаружили, что в МСК различного тканевого происхождения высоко экспрессируются мезенхимные маркеры – N-кадхерин и виментин, но не Е-кадхерин, который продуцируется в клетках эпителиального происхождения линии MCF7. В ходе культивирования МСК из эндометрия (эМСК), костного мозга – (кмМСК), жировой ткани (жМСК) от 5 до 10 пассажа в 2 раза снижается скорость их пролиферации, что сопряжено с уменьшением экспрессии эффекторных (Ki-67, циклина D1) и регуляторных маркеров пролиферации (pRb и p130). Миграционная подвижность эМСК, кмМСК, жМСК от 5 до 10 пассажа не изменяется, а снижается только на 24 пассаже, на котором она ещё значительно превышает таковую в клетках эпителиального происхождения линии HCT116. Для МСК различного тканевого происхождения характерен высокий уровень экспрессия *SNAIL1,2*, низкий – *TWIST1*, которые в ходе пассирования до 10 пассажа не изменяются как и уровни экспрессии регуляторных маркеров подвижности, включающими N-кадхерин, виментин и Е-кадхерин. ЭМСК в отличие от кмМСК и жМСК продуцируют андрогенный рецептор, уровень экспрессии которого значительно снижается к 10 пассажу, что не влияет на миграционную подвижность клеток.

Работа поддержана грантами РНФ № 14-50-00068 и РФФИ № 16-04-00251.

УЧАСТИЕ ДОФАМИНА В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ АРКУАТНОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА.

© *А.Л. Михрина, Л.О. Савельева, Е.В. Михайлова.* Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург
nastya_mihrina@mail.ru

В аркуатном ядре гипоталамуса (АРК) локализованы нейроны различной эргичности, в частности, экспрессирующие нейропептид-Y (NPY)/ агути-подобный пептид (AGRP), про-опиомеланокортин (POMC)/ кокаин и амфетамин регуляторный пептид (CART), которые вовлечены в регуляцию пищевого поведения как, соответственно, орексигенные и анорексигенные пептиды. Известно, что в АРК ослаблен гемато-энцефалический барьер и функция NPY/ AGRP- и POMC/CART-нейронов регулируется различными метаболическими факторами, которые через кровь воздействуют на соответствующие рецепторы. Ранее нами было показано, что нейроны АРК влияют на функциональную активность дофаминергических нейронов мозга. Цель настоящего исследования – выяснить возможность существования обратных связей и влияния дофамина на нейроны АРК. Нами было проведено исследование на фронтальных срезах мозга из области АРК у мышей C57Bl/6J (20-22 г) с помощью двойного флуоресцентного иммуномечения и конфокальной микроскопии. Показано, что Д1- и Д2-рецепторы дофамина локализованы непосредственно в телах POMC/CART-продуцирующих нейронов, так же как Д1 рецепторы - в NPY/AGRP-продуцирующих нейронах. Полученные данные демонстрируют возможность прямого влияния дофамина на нейроны АРК.

Исследование проведено при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-15-10388.

СКАФФОЛДЫ НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК.

© *Ю.А. Нащекина, Н.М. Юдинцева, П.О. Никонов, А.О. Каширова, Т.В. Веселова, И.В. Воронкина, С.А. Александрова, М.И. Блинова.*
ФГБУНУ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
ulychka@mail.ru

Клеточные технологии находят широкое применение в регенеративной медицине для восстановления повреждённых органов и тканей. Неоднократно показано, что клетки, вводимые в зоны повреждений, в виде суспензии не всегда приводят к полному восстановлению повреждённой ткани. Культивирование и трансплантация клеток вместе с носителем или скаффолдом позволяет избежать процедуры обработки протеолитическими ферментами и создать in vitro микроокружение для клеток, которое имитирует нативную ткань. Целью настоящего исследования является формирование двумерных и трёхмерных скаффолдов на основе биодеградируемых полимеров, предназначенных для культивирования и трансплантации клеток.
В процессе выполнения работы получены скаффолды в виде полимерных плёнок на основе поли(D,L-лактида) для культивирования и трансплантации клеток кожи –кератиноцитов. Показано, что эффективность восстановления ткани после трансплантация кератиноцитов вместе с полимерным скаффолдом выше по сравнению с пластом кератиноцитов. Для восстановления костной ткани разработаны трёхмерные пористые скаффолды на основе поли(L,L-лактида).
Работа выполнена на средства гранта РНФ №14-50-00068.

ХЛОРПРОМАЗИН УВЕЛИЧИВАЕТ ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ Ca^{2+} В МАКРОФАГАХ.

© *А.А. Наумова, Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, С.Н. Бутов, Н.И. Крутецкая.*
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург,
anaumova07@gmail.com.

Хлорпромазин (ХП, аминазин, торазин) относится к нейролептикам фенотиазинового ряда, широко используемым для лечения шизофрении. Установлено множественное влияние ХП на клеточные процессы. В связи с этим, с использованием флуоресцентного Ca^{2+}-зонда Fura-2AM нами было исследовано влияние ХП в концентрации 25, 50, 75 и 100 мкг/мл на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+}, $[Ca^{2+}]_i$, в перитонеальных макрофагах крысы. Показано, что в среде, содержащей ионы Ca^{2+}, ХП вызывает дозо-зависимое увеличение $[Ca^{2+}]_i$. При приложении ХП происходит быстрое повышение $[Ca^{2+}]_i$ от базального уровня, равного 92±16 нМ, после

чего наблюдается длительная фаза плато Ca^{2+}-ответа. $[Ca^{2+}]_i$ на фазе плато составляет 147±18, 205±19, 253±16 и 269±16 нМ после добавления 25, 50, 75 и 100 мкг/мл ХП, соответственно. По каждой исследованной концентрации проведено 8 независимых экспериментов. Для выяснения механизма повышения $[Ca^{2+}]_i$ при действии ХП, были проведены эксперименты в номинально бескальциевой среде. Добавление ХП к макрофагам в бескальциевой среде также вызывает быстрое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ с последующей фазой плато, связанное с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+}-депо. При введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдается дальнейшее повышение $[Ca^{2+}]_i$, связанное со входом Ca^{2+} из наружной среды. Таким образом, нами впервые показано, что ХП увеличивает $[Ca^{2+}]_i$, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из Ca^{2+}-депо и последующий вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы.

ХИМИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ МК30 ПОДАВЛЯЕТ АКТИВНОСТЬ БЕЛКА HSP70 В КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.

© *С. А. Нисканен,[1] В. Ф. Лазарев,[1] Д. В. Сверчинский,[1] Е. С. Чухно,[1] И. В. Гужова,[1] Б. А. Маргулис.* [1] [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
slanix@mail.ru.

Опухолевые клетки существуют в условиях различных стрессовых факторов, включая противоопухолевую терапию. Одной из систем защиты клетки являются шапероны, в частности, белки семейства Hsp70, основной функцией которых является связывание поврежденных белков и участие в их рефолдинге. Для понижения устойчивости раковых клеток к противоопухолевым препаратам целесообразно использование ингибиторов шаперонной системы. Нами был проведен скрининг препаратов из коллекции InterBioScreen с целью обнаружения блокаторов способности Hsp70 связывать белки с неправильной конформацией. В результате анализа было обнаружено вещество МК30. Мы проанализировали эффективность протеолиза Hsp70 в присутствии МК30 и обнаружили ингибирующий эффект препарата, что доказывает их взаимодействие. Мы оценили эффективность блокирования шаперонного аппарата в клетках глиомы крысы С6 и меланомы мыши В16 с помощью МК30. Обработка опухолевых культур МК30 приводила к значительному подавлению субстрат-связывающей активности Hsp70 из лизатов клеток. Кроме того, МК30 способен проникать в клетки и подавлять способность Hsp70 восстанавливать денатурированный белок внутри клеток. Таким образом, нами был обнаружен эффективный ингибитор субстрат-связывающей и белок-восстанавливающей активности Hsp70. Важным свойством найденного препарата является его способность проникать в клетки и влиять на внутриклеточные шапероны.

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА В УСЛОВИЯХ ОРГАНОТИПИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO И ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ СЕТЧАТКИ IN VIVO У НИЗШИХ И ВЫСШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ.

© *Ю. П. Новикова, Э. Н. Григорян. ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва,* novikovayulia@gmail.com.

Ремоделирование сетчатки (РС) – явление, представляющее собой одно из последствий патологических изменений, вызванных повреждением популяций нейронов сетчатки вследствие заболевания или травмы. Мы исследовали РС на моделях у низших и высших животных, для понимания основных закономерностей явления. РС у амфибий (взрослых тритонов *Pl. waltl.*) изучали в условиях *in vivo* и *in vitro* после облучения сетчатки глаза ярким светом, отслойки сетчатки и ее тканевого культивирования. Были выявлены регенераторные ответы со стороны трех клеточных популяций: ретинального пигментного эпителия (РПЭ), биполяро-подобных клеток внутреннего ядерного слоя и глиальных клеток Мюллера. Первые мигрировали вовнутрь в толщу сетчатки, делились и затем встраивались в структуру сетчатки, замещая погибшие нейроны. Вторые

смещались в наружный ядерный слой и, дифференцируясь, восполняли утерю фоторецепторов. Третьи – макроглиальные клетки – демонстрировали гипертрофию и пролиферацию. В условиях тканевого 3D культивирования, сетчатка тритона обнаруживала способность реконструирования с участием тех же клеток, а также клеток ростовой зоны сетчатки. Таким образом, РС у тритона основана на ее регенерации, сохраняющей жизнеспособность и функцию.

РС у высших позвоночных *in vivo* изучали на модели индуцированной ярким светом дегенерации сетчатки у взрослых крыс *Wistar*. Здесь РС проявлялось в виде вымещения, трансформации в макрофагальный фенотип клеток РПЭ, топологической транслокации биполяров и амакриновых клеток на место «выбитых» светом фоторецепторов, а также глиального ответа. Клеточные механизмы для РС у крысы оказались сходными с таковыми у тритона, но из-за невозможности репрограммирования клеток сетчатки крысы в нейральном направлении не приводили к клеточному замещению и сохраняли только целостность структуры сетчатки. Результаты экспериментов в условиях культивирования «whole amount» сетчатки крысы подтвердили данные, полученные на модели облучения светом. Таким образом, исследованные нами клеточные механизмы РС у разных животных свидетельствуют о возможности в условиях патологии и клеточной гибели поддерживать структуру этого наиважнейшего сенсорного органа за счет сходных клеточных популяций, однако регенерация сетчатки остается прерогативой амфибий, но не млекопитающих.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ В ООЦИТАХ *SUS SCROFA DOMESTICUS* ПРИ СОЗРЕВАНИИ *IN VITRO*.

© *В.А. Богданов* [1,2], *Д.А. Новичкова*[2], *Т.И. Кузьмина*[2] СПбГУ[1], ФГБНУ ВНИИГРЖ[2], Санкт-Петербург
live8avis@mail.ru.

Липидные капли – многофункциональные органеллы цитоплазмы, активно участвующие в обменных и энергетических процессах клетки. При созревании ооцитов морфология ЛК, их локализация (тип распределения) претерпевают изменения. В соответствии с предложенной Ariu F. et al. классификацией, ЛК локализуются: «периферийно/перинуклеарно»; «диффузно» (ДФ) и «хаотично» (Ariu F. et al., An. Sc. J. (2016) 87, 147–150). Цель настоящего исследования – охарактеризовать локализацию ЛК в ооцитах в зависимости от их функционального статуса (ФС: завершившие фазу роста – BCB^+ ооциты и растущие – BCB^-) до и после культивирования (44 часа). ФС тестировали красителем BCB (бриллиантовый кристаллический голубой, 13 μM, 90 мин.), в результате его воздействия ооплазма BCB^- ооцитов теряет окраску, а в BCB^+ооцитах остается окрашенной. ЛК, выделенные из постмортальных яичников, визуализировали Nile red (1 μM, 5 мин.), анализировали на микроскопе Zeiss Axio Imager.A1. Ооциты культивировали в среде Sage Media Cleavage с 5% Serum Protein Substitute («Coopersurgical», США). До культивирования в BCB^- и BCB^+ ооцитах не обнаружено достоверных различий в локализации ЛК. Резкое снижение доли BCB^- ооцитов с ДФ распределением наблюдали после культивирования [65% (55/85) против 33% (19/58), $P<0.01$]. При культивировании BCB^+ ооцитов такого эффекта не обнаружено. Выявленные отличия свидетельствуют об особенностях транслокации ЛК при созревании ооцитов, изначально находившихся в различном ФС. Этот факт необходимо учитывать при разработке сред для экстракорпорального созревания ооцитов.

ВЛИЯНИЕ ФИТОЭСТРОГЕНОВ НА АДИПОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ.

© *А.В. Панова, М.В. Черноруцкий.* Тверской государственный медицинский университет, Тверь
paanlip@mail.ru

Фитоэстрогеновые средства сегодня широко используются для лечения различных

патологий. Если эффекты фитопрепаратов в области применения позиционируются как известные, то их влияние на адипогенез остается неизученным, хотя проблема набора лишнего веса интересует всех пациентов. Для изучения влияния фитоэстрогенов на адипогенную дифференцировку использовался многокомпонентный гомеопатический фитопрепарат Мастодинон. Гормоночувствительную первичную культуру мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани крысы 3-го пассажа индуцировали по классической схеме дексаметазоном и инсулином, а также в присутствии и отсутствии эстрадиола (конц) и при различных концентрациях Мастодинона (3 мкл/мл; 0,3 мкл/мл; 0,03 мкл/мл среды). На 14 день оценивалось появление жировых капель в клеточном монослое, производилась окраска Oil Red O. Было выявлено, что эстрадиол индуцирует адипогенез как в присутствии, так и в отсутствии гормонов адипогенной дифференцировки, а Мастодинон вызывает адипогенную дифференцировку во всех исследованных концентрациях. Таким образом, фитоэстрогены сходны по эффективности с эстрадиолом в отношении адипогенеза в культуре клеток-предшественников адипоцитов, и это следует учитывать при назначении фитопрепаратов пациентам.

ПОИСК ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫХ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ NF-kB С ПОМОЩЬЮ МЕТА-АНАЛИЗА NGS-ЭКСПЕРИМЕНТОВ НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА.

© *Н. Панюшев,*[1] *Е. Ломерт,*[1] *Д. Тентлер,*[1] *А. Предеус.*[2] [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [2]Институт биоинформатики, Санкт-Петербург, predeus@gmail.com.

Семейство транскрипционных факторов NF-kB играет важную роль в регуляции процессов воспаления, пролиферации и метастазирования. Димеры NF-kB специфично связываются с 9-11 нуклеотидными последовательностями – kB-сайтами. Эти сайты присутствуют в 13600 промоторах генов человека, но немногие влияют на уровень транскрипции. Поиск активных kB-сайтов может помочь в понимании работы сигнального пути NF-kB и его взаимодействии с другими системами регуляции транскрипции. Для данной цели мы собрали данные по RNA-seq, ChIP-seq на p65 субъединицу NF-kB и ChIP-seq на гистонные модификации до и после активации NF-kB. По первым двум наборам данных определяются энхансеры и промоторы, а также NF-kB-зависимые гены. С помощью данных о гистонных модификациях выявляются латентные регуляторные элементы, которые активируются только после индукции NF-kB. Проведенный анализ показал корреляцию уровня экспрессии гена с определенными гистоновыми модификациями и их локализацией относительно kB-сайтов. Полученные данные могут быть использованы для экспериментального изучения связывания NF-kB с kB-сайтами в регуляторных районах генов и влияния NF-kB на транскрипцию.

Данная работа была поддержана грантом РНФ (14-50- 00068) и проведена в сотрудничестве с Ресурсным Центром «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА *AZOT* НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ *DROSOPHILA MELANOGASTER* В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОГО СВЕТОВОГО РЕЖИМА И ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА.

© *Д. О. Перегудова,*[1] *А. А. Москалев.*[1] [1]Институт биологии КНЦ УрО РАН, Сыктывкар Delovoyd3@gmail.com.

Большую роль в детерминации продолжительности жизни и стресс-устойчивости играют механизмы клеточной элиминации и селекции. В случае нарушения этих механизмов есть два пути, ведущих к сокращению продолжительности жизни и гибели организма – это развитие злокачественных новообразований и возраст-зависимое накопление поврежденных, но жизнеспособных клеток, ведущее к повреждению тканей и органов. Хотя точный механизм действия белка, синтезируемого с матрицы гена *azot*, еще точно не изучен, ясно, что он принимает участие в процессах,

связанных с апоптозом. Показано, что с возрастом экспрессия гена *azot* увеличивается, а линии *Drosophila melanogaster*, обладающие дополнительными копиями данного гена характеризуются более высокой продолжительностью жизни и пониженным уровнем нейродегенеративных вакуолей в нервной системе стареющих особей. Мы предположили, что данный ген может принимать участие в изменениях продолжительности жизни, опосредованных влиянием стрессовых факторов окружающей среды, и изучили влияние его сверхэкспрессии в кишечной и нервной ткани на основные показатели продолжительности жизни самцов и самок *Drosophila melanogaster* в условиях измененного светового режима (L/L и D/D) и оксидативного стресса (паракват). У самцов *Drosophila melanogaster* сверхэкспрессия гена *azot* в кишечнике не вызвала изменений продолжительности жизни ни в одном из вариантов эксперимента, в то время, как у самок мы обнаружили достоверное снижение медианной продолжительности жизни при сверхэкспрессии изучаемого гена в тканях кишечника в условиях круглосуточного освещения.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-01596 «Сравнение транскриптомов *Drosophila melanogaster* в ответ на оксидативный, тепловой, холодовой, генотоксический и токсический стрессы», грантом РФФИ № 16-34-00734 «Роль генов циркадных ритмов и элиминации поврежденных клеток в ответе на действие ионизирующих и неионизирующих излучений», грантом Президиума УрО РАН № 15-4-4-23.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ ЛАМИНА A/C (LMNA/C) НА ПРОЦЕСС МЫШЕЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПЕРВИЧНЫХ САТЕЛЛИТНЫХ КЛЕТОК МЫШИ И КЛЕТОК ЛИНИИ C2C12.

© *К. И. Перепелина,* [1,2] *Н. А. Смолина,* [1] *Малашичева А. Б.* [1,2] [1]ФГБУ “Северо-Западный Федеральный Медицинский Исследовательский Центр им. В.А. Алмазова” Санкт-Петербург, [2]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
kseniya.perepelina@mail.ru

Ламины – белки ядерной оболочки, взаимодействующие с хроматином. В последнее время изучается участие ламинов в сигнальных путях благодаря их взаимодействию с внутренней ядерной мембраной и транскрипционными факторами. Ламинопатии – наследственные заболевания, развитие которых связано с мутациями в гене *LMNA/C* и нарушением клеточной дифференцировки тканей мезенхимного происхождения. Большой интерес вызывают ламинопатии, поражающие мышечные ткани. Важным участником мышечной дифференцировки является ген *Myomaker,* экспрессирующийся на поверхности миобластов во время их слияния. В данной работе использовали сателлитные клетки мыши и клетки линии C2C12. Клетки трансдуцировали вирусом, несущим мутантную форму ламина (*LMNA/C G232E* или *LMNA/C R571S*) и дифференцировали в течение 24, 72 часов и 7 дней. Мы установили, что у миобластов, экспрессирующих мутантные формы ламина, нарушены процессы слияния и расхождения ядер к полюсам. С помощью метода ПЦР в реальном времени было показано изменение уровня экспрессии маркеров миогенеза, а также достоверное снижение экспрессии гена *Myomaker* в клетках, экспрессирующих *G232E LMNA/C* мутацию.

РОЛЬ МЕТАБОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ГИППОКАМПА КРЫС ХЛОРИДОМ ТРИМЕТИЛОЛОВА.

© *Е. В. Першина,*[1,2] *В. И. Архипов,*[1,2] [1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, [2]Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино

pershina-ev@mail.ru.

Глутамат является главным возбуждающим нейромедиатором и одним из самых важных регуляторов функций в мозге. Оптимальный уровень активности глутаматергической синаптической передачи, поддерживаемой множеством механизмов, является важнейшим условием нормального функционирования мозга. Избыточное количество глутамата или чрезмерная активация его рецепторов приводит к эксайтотоксичности, которая является компонентом многих нейродегенеративных заболеваний. Интоксикация животных хлоридом триметилолова (ТМТ) рассматривается как экспериментальная модель нейродегенеративных процессов. ТМТ – водорастворимый нейротоксикант, проникающий через ГЭБ, вызывает дегенерацию нейронов и реактивный глиоз в нервной системе млекопитающих, особенно в гиппокампе. В настоящей работе ТМТ-модель была использована для выяснения роли метаботропных рецепторов глутамата (мГлу) в механизмах повреждения нейронов гиппокампа нейротоксикантом.

Эксперименты проводили на самцах крыс линии Вистар, которым вводили ТМТ (7,5 мг/кг, п/к, n=15) и изотонический раствор NaCl в том же объеме контрольной группе (n=10). Для предотвращения судорожной активности через 24 и 48 часов животным делали инъекции нембутала (20 мг/кг, в/б). В течение первой недели у крыс наблюдалась потеря массы тела, но через 3 недели после ТМТ вес животных в опытной и контрольной группе был сходным. Кроме того, нейротоксикант вызывал нарушение когнитивных функций, выявленное в тестах на обучение и переучивание в лабиринте. Через шесть недель после введения ТМТ, выделяли гиппокамп из мозга крыс для оценки уровня мРНК мГлу рецепторов с использованием метода ОТ-ПЦР в реальном времени. В качестве референсного использовали ген бета-актина. Полученные результаты показали, что ТМТ не повлиял на экспрессию генов пресинаптических мГлу2 и мГлу3 рецепторов в отличие от мГлу4 рецепторов, уровень мРНК которых значительно повысился. Экспрессия постсинаптических мГлу5 рецепторов была достоверно снижена в этой временной точке. Отсроченное подавление экспрессии мГлу5 рецепторов, функционально связанных с ионотропными НМДА рецепторами глутамата, также как и повышение экспрессии мГлу4 рецепторов, обеспечивающих снижение выброса глутамата в синаптическую щель, дает основание полагать о наличии компонента эксайтотоксичности в механизмах действия ТМТ. Обнаруженное нами изменение экспрессии генов мГлу рецепторов, по-видимому, отражает вовлечение регуляции на уровне генома, что обеспечивает адаптивные перестройки, направленные на уменьшение ТМТ-вызванной нейродегенерации.

Работа поддержана грантом РФФИ-мол_а № 16-34-01167.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ.

© *Н. В. Плетнева.* Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва
nadand@mail.ru

Флуоресцентные белки (ФБ) из морских организмов и их синие, желтые, красные и дальне-красные генно-инженерные варианты нашли широкое применение в клеточной биологии, биотехнологии и биомедицине в качестве индивидуальных биомаркеров для визуализации процессов в живых организмах. Структура ФБ принимает форму закрытого с торцов β-бочонка сформированного из 11-ти антипараллельных бета-сегментов и одной спирали, в центре которой располагается хромофор. Хромофор образуется из трех аминокислотных остатков X-Tyr-Gly путем внутренней посттрансляционной автокаталитической модификации, которая не требует кофакторов или субстратов. Второй и третий остатки хромофоробразующей последовательности инвариантны. Большое разнообразие спектральных свойств флуоресцентных белков зависит главным образом от структуры зрелого хромофора и его ближайшего аминокислотного окружения. В большинстве случаев, практическое применение ФБ требует разработки мутантных

мономерных вариантов с эмиссией в дальне-красной области спектра (λэм > 610 нм), обладающих высоким квантовым выходом, высокой скоростью созревания хромофора и фотостабильностью. Биологические ткани более прозрачны для излучения дальне-красных белков, чем для белков с меньшей длиной волны эмиссии. Молекулярный механизм формирования хромофора и роль его аминокислотного окружения в проявлении спектральных свойств ФБ далеки от полного понимания.

В связи с этим, важно понять каким образом особенности стереохимии белка определяют его фотофизические свойства, включая склонность к олигомеризации и характеристики цветового спектра. Эти знания необходимы для разработки рационального подхода по созданию улучшенных вариантов белков, удовлетворяющих требуемым критериям. Рентгеноструктурные исследования пространственной организации ФБ на атомном уровне дают важный вклад для успешного решения этой задачи.

Ca^{2+}-ЗАВИСИМАЯ ДЕСЕНСИТИЗАЦИИ NMDA РЕЦЕПТОРОВ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ФУНКЦИИ Na^{+}/Ca^{2+}-ОБМЕННИКА KB-R7943.

© *Е.Э. Погужельская[1,2], П.А. Абушик[1], Д.А. Сибаров[1], С.М. Антонов[1]*. [1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН
polinaabushik@gmail.com
[2]Санкт-Петербургский Политехнический Университет, Санкт-Петербург.

NMDA рецепторы (NMDAR) обладают высокой проницаемостью для ионов Ca^{2+}. При патологиях, связанных с эксайтотоксическим стрессом, их гиперактивация может служить причиной Ca^{2+} перегрузки нейронов и их последующей гибели по механизму апоптоза. Увеличение уровня внутриклеточного Ca^{2+}, вызванное его поступлением в цитоплазму через каналы NMDARs вызывает Ca^{2+}-зависимую инактивацию данных рецепторов. В тоже время Na^{+}/Ca^{2+}-обменник (NCX) играет ключевую роль в выведении ионов Ca^{2+} из цитоплазмы клетки. Эксперименты, проведённые методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации «целая клетка» на первичной культуре коры мозга крыс с использованием KB-R7943 - ингибитора NCX показали, что присутствие KB-R7943 во внеклеточном растворе, содержащем ионы Ca^{2+}, значительно усиливает Ca^{2+}-зависимую десенситизацию токов NMDAR. В тоже время, KB-R7943 проявил себя как коагонист NMDAR, коактивируя их по глициновому сайту. Результаты флуориметрической регистрации внутриклеточного Ca^{2+} подтверждают увеличение десенситизации NMDAR при действии на них KB-R7943. Таким образом, регуляция десенситизации NMDAR KB-R7943 предполагает наличие функционального взаимодействия рецепторов с NCX.

Работа поддержана грантами РФФИ 15-04-08283 и 16-04-00653.

ТРАНСКРИПЦИЯ ПРИЦЕНТРОМЕРНОЙ МАЖОРНОЙ САТЕЛЛИТНОЙ ДНК В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ РАКА ЛЕГКИХ МЫШИ.

© *Н.В. Пономарцев [1], А.И. Бричкина [2], Н.И. Енукашвили [1]*. [1]Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург; [2] Institute of Molecular and Cell Biology, A-STAR, Singapore. ponomartsev@yandex.ru

Прицентромерная сателлитная ДНК деконденсируются и активно транскрибируются в клетках некоторых опухолей и клеточных линиях. Невыясненным остается вопрос о наличии таких транскриптов в микроокружении опухоли и нормальной ткани. Цель настоящей работы – исследование пространственно-временной организации транскрипции перицентромерной ДНК мажорного сателлита (MaCat) на мышиной модели $K\text{-}ras^{G12D}$, в которой индуцирован канцерогенез легкого. Нами проанализирован уровень транскрипции MaCat в опухоли, опухолевом микроокружении и нормальном легком с помощью РТ-ПЦР образцов тканей легкого мыши. В большинстве случаев (7 из 8) интенсивность транскрипции MaCat убывала в ряду нормальная ткань – микроокружение - клетки опухоли. Основную часть микроокружения составляют опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) и опухоль-ассоциированные макрофаги (ОАМ).

Мы исследовали изменение транскрипции MaCat в легочных фибробластах, индуцированных к переходу к ОАФ фенотипу с помощью TGFb, и в макрофагах, индуцированных IL4 к переходу в ОАМ. В ОАФ транскрипция MaCat была выше в 1.3 раза, чем в контрольных необработанных, однако в макрофагах уровень транскрипции MaCat снижался впервые 4 ч после обработки IL4 в 2.9 раза. Мы предполагаем, что регуляция транскрипции MaCat в разных типах клеток идет разными путями при канцерогенезе тканей легких мыши.

КАРИОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОТОМКОВ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПЕРЕЖИВШИХ СУБЛЕТАЛЬНОЕ РЕНТГЕНОВСКОЕ ОБЛУЧЕНИЕ.

© *Ю.С. Попелышко, З.В. Ковалева, Т.М. Гринчук.* ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
grintat@bk.ru

Задачей настоящей работы было установить степень кариотипической стабильности эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека (эМСК) после воздействия на них рентгеновского излучения в сублетальной дозе. Объектом исследования послужили эМСК, выделенные из десквамированного эндометрия менструальной крови здоровой женщины.

Облучение эМСК проводили сублетальной дозой 5 Гр на 9-ом пассаже, после чего они были возвращены в стандартные условия культивирования. На 13-ом пас. потомки клеток, претерпевших облучение, кариотипировали. В работе был использован метод дифференциальной окраски хромосом на G-диски. Цитогенетический анализ показал, что потомки облученных клеток в своем большинстве (более 80%) характеризовались нестабильностью структуры кариотипа. Основным типом перестроек в облученных эМСК были хромосомные поломки, как прицентромерные, так и дистальные. В хромосомах 1, 4 и X поломки были выявлены неоднократно.

Результаты настоящей работы позволили говорить о том, что облучение эМСК рентгеновским излучением в сублетальной дозе 5 Гр приводит к дестабилизации структуры кариотипа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект 14-50-00068).

РАЗНООБРАЗИЕ ЧЕТЫРЕХДОМЕННЫХ ПОТЕНЦИАЛ-УПРАВЛЯЕМЫХ КАТИОННЫХ КАНАЛОВ ЭУКАРИОТ

© *И. А. Поздняков.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
pozdnyakov@cytspb.rssi.ru.

Четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы (ЧД ПКК) – это семейство ионных каналов, в состав которого входят пять хорошо изученных подсемейств катионных каналов животных и грибов: потенциал-управляемые натриевые каналы (Na_v), потенциал-управляемые кальциевые каналы, активирующиеся при высоких потенциалах (HVA Ca_v), потенциал-управляемые кальциевые каналы, активирующиеся при низких потенциалах (LVA Ca_v), потенциал-неуправляемые каналы натриевой утечки (NALCN) и потенциал-неуправляемые кальциевые каналы грибов (Cch). Представители первых четырех подсемейств идентифицированы у животных, в чьих тканях они выполняют функции генерации и распространения потенциала действия, участвуя в процессах возбуждения, ритмической и пейсмекерной активности. Кроме того, представители этих подсемейств найдены у родственных животным и грибам одноклеточных хоанофлагеллят и апусомонад. Каналы подсемейства Cch обнаружены только у грибов, где они функционируют как депо-управляемые кальциевые каналы. В то же время представители ЧД ПКК известны и у некоторых других групп эукариот, однако филогенетическое положение и функциональные особенности этих каналов остаются неизученными.

С помощью анализа геномных, транскриптомных и белковых баз данных нами были идентифицированы 277 аминокислотных последовательностей ЧД ПКК эукариот. При этом у многих таксономических групп каналы семейства ЧД ПКК были обнаружены впервые.

Реконструкция филогении этих каналов методами максимального правдоподобия и байесовского анализа выявила, что многие группы эукариот обладают своими собственными подсемействами ЧД ПКК, не образующими общих клад ни с одним из известных подсемейств ЧД ПКК животных или грибов. Кроме того, некоторые группы эукариот, такие как альвеоляты и страменопилы, обладают филогенетическим разнообразием ЧД ПКК, сопоставимым с таковым у многоклеточных животных.

Поскольку филогенетическое разнообразие может отражать функциональное разнообразие, нами был проведен биоинформатический анализ некоторых функционально значимых участков идентифицированных ЧД ПКК, а именно: селективного фильтра, сегментов S4 и участка, гомологичного инактивационным воротам каналов Na_v. Сопоставление данных биоинформатического и филогенетического анализа показало, что, в то время как для каждого из подсемейств ЧД ПКК животных характерно наличие строго определенных наборов структурно-функциональных детерминант, для ряда других групп эукариот (например, динофлагеллят) характерны различные комбинации вариантов функционально значимых участков в рамках одного подсемейства ЧД ПКК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-10116) на базе Института цитологии РАН.

СОСТАВ МАЖОРНЫХ ЗОН РЕАКЦИИ AFLP КЛЕТОК А 431.

© *[1]Потолицына Е.А., [2]Кропачева И.В., [1]Чудинова Т.В., [1,2]Галактионов Н.К.* [1]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, [2] Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
gingeryhoro@gmail.com

Половой процесс – основа разнообразия и эволюционного успеха многоклеточных животных. Казалось бы, без полового процесса, размножение должно сводиться к клонированию, но анализ таких “клонов” выявил вариабельность их геномов, выраженную в перераспределении повторенных последовательностей ДНК, как тандемных (Grevelding, 1999), так и диспергированных (Galaktionov et al, 2013). Диспергированные повторы или мобильные элементы (МЭ), составляют до половины эухроматической части генома. Копии МЭ способны к перемещению и рекомбинации, а сами их последовательности служат мишенями miRNA. Активность МЭ регулируется в соматических клетках, однако зачастую наблюдается потеря генетической стабильности как дифференцированных, так и стволовых клеток (Haase, 2016) и именно МЭ кажутся наиболее вероятным источником генетического разнообразия вне полового процесса.

Линии трансформированных клеток крайне гетерогенны и представляют удобную модель для оценки вклада МЭ в формирование генетической изменчивости. Генотипирование клеток А 431 и ДНК, выделенной из мононуклеаров крови человека, методом AFLP (amplified fragment length polymorphism) и электрофоретическое разделение продуктов реакции позволило выявить гетерогенный набор зон с молекулярной массой 800 – 250 п.н. Анализ длин продуктов разделения выявил в их составе консервативные и вариабельные зоны. При этом количество амплификата в консервативных зонах различно между геномами А 431 и ДНК мононуклеаров. Молекулярный анализ консервативной зоны 400 п.н. выявил в ее составе участок последовательности, кодирующей домен Gag/p30 эндогенного ретровируса (ERV) человека HERV48I. ERV – эволюционно новые, элементы генома, многие из которых не утратили транспозиционной активности и служат сайтами посадки miRNA. Разная насыщенность зон, несущих HERV48I говорит о разнице в количестве копий этого элемента в геномах мононуклеаров и А 431 и может служить одним из факторов их генетической нестабильности.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ КРОВЕТВОРНЫХ И НЕКРОВЕТВОРНЫХ ОРГАНОВ В ПРЕНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ.

© *С.Г. Рамазанова, О.В. Паюшина, О.Н. Шевелева, Н.Н. Буторина, С.С. Бухинник, Е.И.*

Домарацкая. ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, sabina464@mail.ru

В ходе онтогенеза мезенхимные стромальные клетки (МСК) присутствуют практически во всех тканях, оказывая на них регуляторное влияние – в частности, создавая кроветворную нишу в органах гемопоэза. Однако зависимость свойств МСК от их локализации изучена недостаточно. В частности, сравнение МСК из кроветворных и некроветворных органов могло бы прояснить вопрос, вносит ли участие МСК в поддержании гемопоэза какую-либо специфику в их фенотип и потенции. В этой связи целью работы стал анализ свойств МСК из селезенки, печени, тимуса, кости, кожи и мышц 20-суточных плодов крысы. Эффективность клонирования стромальных клеток кости, кожи и мышц намного превышала таковую для остальных органов. При этом маркер МСК CD73 выявлялся на части клеток в культурах печени, селезенки, тимуса и мышц, но, как правило, отсутствовал на клетках кости и кожи; антиген CD90 присутствовал на большинстве клеток из всех тканей, кроме кожи, где его несли не более половины клеток. МСК из кости обладали большей способностью к остеогенезу, чем из мышц и селезенки; у клеток кожи, печени и тимуса эта способность отсутствовала или была крайне слабой. Выраженные адипогенные потенции были отмечены у МСК кости, тимуса, мышц и в меньшей степени кожи; в культурах печени и селезенки формировались лишь единичные адипоциты. Таким образом, в работе выявлены межорганные различия в содержании и свойствах МСК, однако их явной зависимости от активности гемопоэза не обнаружено.

ИЗМЕНЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ММСК К ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ПРИ РЕПЛИКАТИВНОМ И СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОМ СТАРЕНИИ.

© *А.Ю. Ратушный, Л.Б. Буравкова.* ГНЦ РФ-Институт медико-биологических проблем РАН, Москва
ratushkin@mail.ru

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) представляют собой малодифференцированный пул клеток, поддерживающий во взрослом организме процессы регенерации и обновления тканей. На настоящий момент нет единого мнения об изменениях дифференцировочного потенциала данного типа клеток с возрастом, поэтому цель нашего исследования заключалась в оценке остеогенного и адипогенного потенциала ММСК *in vitro* при репликативном и стресс-индуцированном старении. Для экспериментов использовали ММСК, выделенные из жировой ткани человека. Репликативное старение заключалось в долговременном культивировании клеток до 21 пассажа. Стресс-индуцированное старение ММСК осуществляли воздействием сублетальных концентраций H_2O_2 в течение 24 часов. Согласно полученным данным, на поздних пассажах увеличивается остеогенный потенциал ММСК, в то время как адипогенный снижается. Аналогичные результаты получены в экспериментах по стресс-индуцированному старению. Таким образом, наше исследование не только позволяет сделать вывод об изменениях дифференцировочного потенциала при старении *in vitro*, но и подтверждает сходство проявляемых клеткой реакций на репликативное и стресс-индуцированное старение.

Работа выполнена при поддержке программы «интегративная физиология».

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ РАЗЛИЧИЙ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ БЕТА-2-МИКРОГЛОБУЛИНА И ЕГО УКОРОЧЕННЫХ ФОРМ.

© *Н.П.Родина[1,2], А.И.Сулацкая[1], И.М.Кузнецова[2], К.К.Туроверов[1,2].*[1]Институт

цитологии РАН, Санкт-Петербург, natalia240994@gmail.com
[2]Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

При гемодиализном амилоидозе, возникающем у пациентов с острой почечной недостаточностью, обнаруживаются амилоидные фибриллы на основе полноразмерного бета-2-микроголобулина, а также его укороченных форм без участков полипептидной цепи из 6 и 10 N-концевых а.к. Целью настоящей работы стало исследование физико-химических свойств и сравнительное изучение структуры этих амилоидных фибрилл. В работе использованы методы электронной микроскопии, абсорбционной и собственной УФ-спектроскопии, метод кругового дихроизма, а также специально разработанный подход, основанный на абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии растворов фибрилл со специфическим зондом тиофлавином Т, подготовленных методом равновесного микродиализа. Показано, что исследуемые амилоидные фибриллы различаются своими фотофизическими характеристиками, морфологией, параметрами связывания с тиофлавином Т и характеристиками связанного красителя, что свидетельствует о полиморфизме этих амилоидных фибрилл. На основании полученных результатов сделано заключение о том, что небольшие участки а.к. последовательности мономерных белков и, в частности, N-концевые а.к., могут играть важную роль в полиморфизме амилоидных фибрилл.

Работа выполнена при поддержке Программы "МКБ" РАН, грантов РФФИ 16-54-00230_Бел, 16-04-01614_а и стипендии Президента РФ СП-1982.2015.4.

ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМЫЙ ИНСУЛИН ПРЕПЯТСТВУЕТ РАЗВИТИЮ РЕТИНОПАТИИ У КРЫС СО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА.

© *Ю. Р. Рыжов, С. Р. Юсенко, Т. В. Федоткина, К. В. Деркач, М. Л. Фирсов, А. О. Шпаков.* Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, julian.ryzhov@gmail.com.

Несмотря на то, что диабетическая ретинопатия (ДР) является одним из тяжелых осложнений сахарного диабета 1-го типа (СД1), эффективные подходы для ее коррекции и предотвращения отсутствуют. Предполагается, что снижение уровня инсулина в мозге при СД1 может негативно влиять на сенсорные функции, включая зрительную. Для компенсации дефицита инсулина в мозге может быть использован интраназальный способ его доставки. Цель работы состояла в изучении влияния интраназального введения инсулина (ИИ, 0.48 МЕ/крысу/сутки, со 2-го дня после индукции СД1) на развитие ДР у крыс с СД1, вызываемым инъекциями стрептозотоцина (в/б, 40 и 30 мг/кг, интервал 10 дней). В экспериментах исследовали три группы крыс – контроль (К, *n*=6), диабет (Д, *n*=21), диабет с лечением ИИ (ДИ, *n*=10). Электроретинограмму (ЭРГ) снимали 1 раз в 2 недели в течение 8 недель. Функцию сетчатки оценивали по максимальной амплитуде b-волны ЭРГ и полунасыщающей интенсивности (ПНИ) для b-волны. Со 2-й по 8-ю неделю максимальные амплитуды b-волн в группах Д и ДИ были меньше, чем в контроле. Со 2-й по 6-ю неделю максимальная амплитуда в группе Д менялась слабо, но на 8-й неделе отмечали ее падение на 49 % относительно 6-й недели. В группе ДИ снижения максимальной амплитуды не происходило. Со 2-й по 4-ю неделю ПНИ во всех группах была сходной. Однако на 6-й неделе ПНИ в группе Д повышалась в 2.4 раза, на 8-й неделе – в 13 раз в сравнении с 4-й неделей СД1. В группах К и ДИ ПНИ не менялась. Таким образом, лечение ИИ предотвращает падение световой чувствительности сетчатки у крыс с СД1, на что указывает сохранение ПНИ в группе ДИ со 2-й по 8-ю неделю на контрольном уровне. При этом амплитуды b-волн ЭРГ в группе ДИ снижались в сравнении с контролем, хотя не так сильно, как в группе Д. Полученные данные указывают на выраженный ретинопротекторный эффект ИИ при экспериментальном СД1.

ВЛИЯНИЕ ФРАГМЕНТОВ АГУТИ-ПОДОБНОГО ПЕПТИДА (AGRP) НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НОРАДРЕНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ МОЗГА.

© *Л.О. Савельева, А.Л. Михрина.* Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, LyudmilaSavelevaBiology@yandex.ru

AgRP экспрессируется только нейронами аркуатного ядра гипоталамуса. В ходе посттрансляционных изменений из его промолекулы образуется три активных фрагмента AgRP: 25–51, 54–82, 83–132. Проекции AgRPергических нейронов были выявлены в голубом пятне — норадренергической области мозга (locus coeruleus — LC). Цель исследования — изучить влияние фрагментов AgRP на функциональную активность норадренергических (НА) нейронов LC. Мышам C57BL/6J с помощью стереотаксиса в LC билатерально вводили по 0,5 мкл AgRP25–51 или AgRP83–132 (0,6 нмоль), либо 0,9 % NaCl (контроль). Через 3 часа после инъекции мозг был фиксирован для анализа оптической плотности (ОП) ключевых ферментов биосинтеза норадреналина (тирозингидроксилазы — ТГ и дофамин-бета-гидроксилазы — ДБГ). После введения AgRP25–51 в НА-нейронах выявлено уменьшение ОП фосфорилированной по серину-31 формы ТГ (ТГф31) на 47 % и ДБГ на 62 % ($p<0,05$). После введения AgRP83–132 наблюдалось уменьшение ОП ТГф31 на 33 %, ДБГ на 44 % и фосфолированной по серину-40 формы ТГ на 47 % ($p<0,05$). Полученные данные демонстрируют тормозный эффект фрагментов AgRP на активность НА-нейронов. Регулируя активность ТГ и уровень ДБГ, оба фрагмента AgRP изменяют функциональную активность НА-нейронов LC через различные механизмы внутриклеточной сигнализации.

ФОТОДИНАМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ РАДАХЛОРИНА НА КЛЕТКИ HELA.

© *А. В. Салова,[1] А. В. Белашов,[2] Н. В. Петров,[2] И. В. Семенова,[2] О. С. Васютинский,[2] Е. С. Корнилова, [1] Т. Н. Беляева. [1]* [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, avsalova@gmail.com
[2]ФТИ им. А. Ф. Иоффе, Санкт-Петербург

Фотодинамическая терапия используется для деструкции опухолей определенного типа. В этом случае применяются фотосенсибилизаторы, которые накапливаются в опухолевых клетках и при облучении светом определенной длины волны генерируют синглетный кислород и другие реактивные продукты, приводящие к гибели клеток. В качестве фотосенсибилизатора часто используется Радахлорин, основным компонентом которого является хлорин е6. Целью работы было исследование действия УФ облучения на клетки HeLa после введения Радахлорина.

С помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии было показано, что Радахлорин (5 мкг/мл) проникает в клетки через плазматическую мембрану и накапливается в околоядерных структурах. Проанализирована степень накопления Радахлорина в зависимости от длительности инкубации. Исследовано воздействие на клетки лазерного излучения с длиной волны 405 нм (мощностью 0.2 Вт/см^2), находящейся в полосе поглощения фотосенсибилизатора. Обнаружено, что облучение в течение 1 мин вызывало морфологические изменения клеток характерные для апоптоза, в то время как 5-ти минутное облучение приводило к некротическим изменениям.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЭКЗОСОМ ПУТЕМ МАРКИРОВКИ ТЕТРАСПАНИНА CD63 ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ БЕЛКАМИ.

© *А.В. Селенина,[1,2] В.А. Куличкова,[2] А.Н. Томилин,[2] А.С. Цимоха.[2]* [1]Биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета
nessa-5@yandex.ru
[2]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Экзосомами называют микроскопические внеклеточные везикулы

(МВТ) диаметром 30-100 нм, выделяемые в межклеточное пространство различными клетками млекопитающих. Считается, что данные везикулы представляют собой особый способ коммуникации между клетками, за счет передачи различных белков и РНК, однако, механизмы секреции и поглощения данных везикул не совсем ясны. Для прижизненной визуализации разнообразных процессов в клетке в настоящее время используют различные флуоресцентные белки. Причем чаще всего использую генетические конструкции в виде слитых белков интереса с флуоресцентным белком. Таким образом, можно соединить флуоресцентный белок и белок, который является маркером МВТ/поздних эндосом или экзосом. Одним из таких маркеров является тетраспанин CD63. У белков тетраспанинов, однако, С- и N- концы могут нести физиологически важные функции за счет взаимодействия с другими белками, например, между белками из своего же семейства или различными киназами. Поэтому такое маркирование экзосом флуоресцентным белком нуждается в подробном сравнительном анализе функционирования в клетке полученного рекомбинантного белка CD63, слитого с флуоресцентным белком с С- или N-конца. Мы создали две клеточные линии на основе клеток HeLa, в которых стабильно экспрессировался тетраспанин CD63, сшитый с N-конца с зеленым флуоресцентным белком EGFP или с красным флуоресцентным белком tagRFP с С-конца. Далее мы анализировали жизнеспособность этих клеточных линий и оценивали функционирование рекомбинантного тетраспанина CD63, слитого с флуоресцентным белком на С- или N-конце в сравнении с белком дикого типа. Несмотря на отсутствие негативного влияния экспрессии рекомбинантного CD63 на жизнеспособность клеток и их нормальное функционирование, предпочтительнее оказалось слияние тетраспанина CD63 с флуоресцентным белком со стороны N-конца. Эти данные позволят в дальнейшем исследовать функции данного трансмембранного белка, а также позволят осуществить прижизненную визуализацию транспорта экзовезикул.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (16-04-01667).

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ МЫШИНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ СНИЖАЕТСЯ ПРИ ОБРАБОТКЕ ИНГИБИТОРАМИ ПРОТЕАСОМ.

© *А.В. Селенина,*[1,2] *С.А.Синенко,*[2] *А.Н.Томилин,*[2] *А.С. Цимоха.*[2] [1]Биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета
nessa-5@yandex.ru
[2]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Получение индуцированных стволовых клеток с помощью всего четырех генов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc представляет собой очень удобный и инновационный метод, однако механизмы самого репрограммирования до конца не изучены. Помимо геномного репрограммирования, существует еще и белковый уровень, который также играет большую роль в этом процессе. Основным способом поддержания белкового гомеостаза в клетках является работа мультисубъединичных протеазных комплексов - протеасом. Протеасома состоит из коровой 20S и одной или двух регуляторных 19S частиц. При определенных условиях конститутивные каталитические субъединицы 20S коровой частицы beta1, beta2 и beta5 могут замещаться на особые субъединицы – beta1i(LMP2), beta2i(MECL-1) и beta5i(LMP7). В таком случае протеасома называется иммунопротеасомой. Также известно, что в эмбриональных стволовых клетках человека наблюдается повышенная экспрессия генов иммуносубъединиц протеасом, причем во время дифференцировки происходит заметное снижение синтеза этих субъединиц. Мы обрабатывали мышиные эмбриональные фибробласты (МЭФ) ингибиторами иммунопротеасом PR-957 и конститутивных протеасом MG-132 в течение всего периода репрограммирования. Концентрации ингибиторов мы подобрали так, чтобы они не оказывали влияние на жизнеспособность МЭФ. Репрограммирование МЭФ в индуцированные стволовые клетки оценивали по способности МЭФ образовывать клоны стволовых клеток, анализ которых мы проводили с помощью окраски на маркер плюрипотентности – щелечную фосфатазу. Мы показали, что при воздействии ингибиторов протеасом на МЭФ в процессе

репрограммирования снижается эффективность образования клонов, что свидетельствует от том, что протеасомы играют роль в образовании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (14-50-00068).

МОДЕЛЬ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА КРЫС.

© *В. С. Ситникова,*[1,2] *М. А. Иванова,*[2] *П. А. Абушик,*[1] *С. М. Антонов.*[1] [1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, [2]Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург, polinaabushik@gmail.com.

Гипергомоцистеинемия, повышенное содержание аминокислоты гомоцистеин (HCY) в плазме крове и цереброспинальной жидкости, сопряжена со многими нейродегенеративными заболеваниями. Ранее мы показали, что наряду с глутаматом (Glu), в нейронах коры мозга HCY активировал NMDA и mGluR5 рецепторы глутамата, однако вопрос действия паталогически высоких концентраций HCY (> 30 мкМ) на клетки мозжечка оставался открытым. В первичной культуре нейронов мозжечка крыс нейротоксическое долговременное (60 мин, 5 и 24 ч) действие 100 мкМ HCY было сопоставлено с действием 30 мкМ NMDA и 100 мкм Glu. Кратковременное действие HCY (2 и 6 мин) также было сопоставлено с действием NMDA и Glu в экспериментах по исследованию внутриклеточных Ca^{2+} ответов нейронов с помощью fluo-3AM и изменения митохондриального мембранного потенциала (φ_{mit}) с помощью rhodamine 123. Полученные результаты показали, что кратковременное действие HCY, в отличие от NMDA и Glu, вызывает различающиеся по динамике Ca^{2+} ответы и слабое падение φ_{mit} по сравнению с полным разобщением дыхательной цепи. Однако 60 мин действие HCY, подобно NMDA и Glu, вызывало сильное увеличение Ca^{2+} в нейронах и полное падение φ_{mit}, при этом в течение 5 и 24 часов развивался апоптоз ~30 % нейронов.

Работа поддержана грантами РФФИ 14-04-00227, 16-04-00653 и стипендией Президента РФ.

ВЛИЯЕТ ЛИ ЦИКЛИЧЕСКИЙ АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТ НА КАСКАД ФОТОТРАНСДУКЦИИ В КОЛБОЧКАХ?

© *В. С. Ситникова,*[1] *М. Л. Фирсов,*[2] *Л. А. Астахова.*[2] [1]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Кафедра «Медицинская физика», [2]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург lubkins@yandex.ru.

В каскаде зрительной трансдукции палочек и колбочек вторичным мессенджером является цГМФ. Однако накопился ряд фактов, свидетельствующих о регулировании функций фоторецепторов цАМФ. Может ли цАМФ модулировать каскад фототрансдукции у позвоночных – этот вопрос уже положительно решен для палочек (Astakhova et al., 2012). А как обстоит дело в колбочках? Этому было посвящено наше исследование.

Материал: сетчатка рыб *Carassius carassius*.

Метод: регистрация тока одиночных колбочек при помощи всасывающей микропипетки, инкубация колбочек с активатором АЦ – форсколином или ингибитором цАМФ-специфичной ФДЭ-4 – ролипрамом (с целью повышения $[цАМФ]_{in}$).

Результаты: форсколин значительно уменьшает темновой ток колбочек (на 48% (n=7)), и замедляет выключение фотоответа (постоянная времени увеличивается в 2,9±0,3 раза (n=8)), но не приводит к изменению чувствительности. Ролипрам же не влиял ни на один из оцениваемых параметров. Сравнение эффектов изменения $[цАМФ]_{in}$ в палочках и колбочках показывает: в колбочках выключение фотоответа замедляется в большей степени, чем в палочках, но не сопровождается ростом чувствительности к свету, но снижается темновой ток. Ролипрам в колбочках не оказывает никакого действия, что может указывать на отсутствие ФДЭ-4 в контуре синтеза-гидролиза цАМФ в колбочках, в отличие от палочек.

РЕГУЛЯЦИЯ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ В КЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА.

© *К. В. Скобелева, М. А. Рязанцева, Е. В. Казначеева.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
ks.skobeleva@ya.ru.

Большая часть мутаций, ассоциированных с наследственной болезнью Альцгеймера, обнаружена в гене белка пресенилина-1. Пресенилин-1 является каталитической субъединицей гамма-секретазного комплекса, который в ходе созревания расщепляется на терминальные фрагменты. В различных клеточных и животных моделях было продемонстрировано, что накопление полноразмерного пресенилина-1 приводит к изменению депо-управляемого входа. Депо-управляемый вход кальция развивается в результате опустошения внутриклеточных кальциевых депо. Мы предположили, что неразрезанный пресенилин-1 и его терминальные фрагменты конкурируют за связывание с некой внутриклеточной мишенью, вовлеченной в депонирование кальция. Значение такой конкуренции выяснялось с помощью измерения внутриклеточной концентрации кальция флуоресцентным зондом в мышиных эмбриональных фибробластах с нокаутом обоих генов пресенилина. Кроме того известно, что изменение активности депо-управляемых каналов приводит к изменению регуляции кальций-зависимых транскрипционных факторов, в том числе ядерного фактора активации Т-лимфоцитов (NFAT). Нами было обнаружено, что в клеточной модели болезни Альцгеймера изменяется скорость перемещения NFAT в ответ на активность депо-управляемых кальциевых каналов.

Данная работа поддержана грантами РФФИ №16-34-00649, РФФИ №16-04-01125, РНФ № 14-14-00720.

АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПОДХОДОВ, ПОЗВОЛЯЮЩИХ ИССЛЕДОВАТЬ РАЗЛИЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РОСТА ЖИРОВОЙ ТКАНИ.

© *Д.Д. Смирнов,[1,2] Р.И. Дмитриева.[2]* [1]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия, [2]Северо-Западный Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия, mitya.smirnov@gmail.com.

Рост жировой ткани происходит как за счет увеличения количества липидов в уже существующих адипоцитах (гипертрофия) так и в результате дифференцировки преадипоцитов в новые жировые клетки (гиперплазия). Гипертрофия ведет к «перегрузке» адипоцита липидными каплями, в результате чего развиваются резистентность к инсулину, метаболические нарушения, воспалительные реакции. Гипертрофия и гиперплазия регулируются множеством механизмов. В работе были использованы как экспериментальные (1), так и аналитические (2) подходы к исследованию роста и развития жировой ткани. (1) Анализ корреляции экспрессии регуляторов роста и функций жировой ткани на разных стадиях адипогенеза подтвердил возможность использования in vitro модели для исследования механизмов дифференцировки и для изучения функциональных свойств адипоцитов. (2) Посредством метода главных компонент при анализе Cage данных были выявлены значительные различия в профиле экспрессии генов на 4 и 8 дни адиподифференцировки, но между 8 и 12 днем существенных различий не наблюдалось. Это было подтверждено анализом дифференциально экспрессирующихся генов, на этапе с 8 по 12 день протекают преимущественно метаболические процессы, тогда как с 4 до 8 идет реорганизация клеточных компонентов. Было показано, что механизмы гиперплазии и гипертрофии можно исследовать in vitro на ранних (1-4 день) и поздних (8-12 день) сроках дифференцировки соответственно.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №16-15-1078 от 18.05.2016

ПОЛИМОРФИЗМ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНОМАХ ПАРТЕНИТ *HIMASTHLA ELONGATA*

© *А.И. Соловьева* [1] *Н.К.Галактионов* [1,2] *А.М. Горбушин* [3], *О.И. Подгорная*[1,2, 4]. [1] Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, orcinuca@gmail.com
[2] Санкт-Петербургский государственный университет
[3] Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Санкт-Петербург
[4] Дальневосточный федеральный университет, Владивосток.

В настоящей работе исследовали возможную роль транспозонов в формировании генетического полиморфизма партенит трематоды *Himasthla elongata*. У трематод сложный жизненный цикл со сменой животных-хозяев и чередованием партеногенетических и гермафродитных поколений. Ранее считали, что особи партеногенетического поколения генетически идентичны, так как являются продуктом диплоидного партеногенеза. Однако на ряде видов трематод показали, что у особей на этой стадии можно наблюдать клональную изменчивость. Мы генотипировали клоны церкарий *H.elongata* методом S-SAP (Sequence Specific Amplification Polymorphism). В результате в полиморфных и консервативных фрагментах найдены участки ретроэлементов CR1, RTE, BEL и SR2. Методом флуоресцентной *in situ* гибридизации выявили дисперсное распределение зондов к CR1-подобным и кластеризацию зондов к BEL-подобным ретроэлементам. Компьютерный анализ показал наличие гомологичных клонированным фрагментам последовательностей в транскриптоме *H.elongata*. Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что ретроэлементы генома *H.elongata* вносят вклад в клональную изменчивость церкарий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (мол_а) № 16-34-00603 и РНФ (проект № 15-15-20026).

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ, ФОТОТОКСИЧНОСТЬ И СЕЛЕКТИВНОСТЬ НАКОПЛЕНИЯ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ КЛАСТЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ МОЛИБДЕНА ВКЛЮЧЕННЫХ В КРЕМНИЕВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ И ИХ КОНЪЮГАТОВ С АНТИТЕЛАМИ.

© *А.О. Соловьева*[1], *Т.Н. Позмогова*[1], *А.А. Красильникова*[1], *Ю.А. Воротников*[2], *М.А. Шестопалов*[1,2]. [1]Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии, Новосибирск, [2] Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, Новосибирск
solovevaao@gmail.com

Одним из ключевых свойств октаэдрических кластерных комплексов молибдена являются генерация синглетного кислорода, рентгеноконтрастность и люминесценция в красной области спектра, что делает их интересными для использования в фотодинамической терапии и биовизуализации. Однако такие комплексы не устойчивы в воде и физиологических жидкостях. Поэтому, для повышения их биодоступности, они были заключены в кремниевые наночастицы. Синтезированные кремниевые наночастицы состава: $\{Mo_6I_8\}@SiO_2$ имеют хорошую растворимость, интенсивную люминесценцию, фотостабильность и низкую скорость выхода из клеток по сравнению с отдельными молекулами вещества. Для повышения селективности накопления таких материалов в опухолевых клетках линии SKBR3 (клетки опухоли молочной железы) они были конъюгированы с антителами к рецептору эпидермального фактора роста HER2.

Таким образом, целью данной работы было определение темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности синтезированных веществ, динамики их проникновения и выведения из клеток, определение их внутриклеточной локализации, а также селективность накопления данных веществ, конъюгированных с антителами к рецептору эпидермального фактора роста HER2 (Герцептин) в клетках линии SKBR3.

В результате нами было показано, что $\{Mo_6I_8\}@SiO_2$ не оказывает значительного влияние на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток. Максимальное накопление препарата в клетках наблюдается через 2 часа инкубации клеток с препаратом. Было определено, что препарат активно выходит из клеток в течение первых 2-х часов, однако интенсивность флуоресценции клеток в течение последующих 24 часов остается на высоком уровне. При помощи ТЭМ нами было показано, что $\{Mo_6I_8\}@SiO_2$ локализуются в цитоплазме, как в виде эндосомо-подобных структур, так и виде отдельных наночастиц. Продемонстрирована высокая фотоиндуцированная токсичность данных наночастиц. Далее была определена кинетика накопления $\{Mo_6I_8\}@SiO_2$@Herceptin в клетках линий SKBR3 и Hep-2. Было показано, что скорость накопления конъюгата в клетках линии SKBR3 значительно выше по сравнению с клетками Hep-2. Данные результаты свидетельствуют о высокой селективности конъюгатов к линии клеток, характеризующихся гиперэкспрессией HER2.
Таким образом, $\{Mo_6I_8\}@SiO_2$ имеет низкую темновую и высокую фотоиндуцированную токсичность, характеризуются достаточно быстрым проникновением в клетки и низкой скоростью выхода из клеток. Благодаря конъюгации синтезированных наночастиц с антителами достигается селективность их накопления в целевых клетках. Таким образом, вышеописанные свойства данных соединений делают их перспективными агентами для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики.

Данная работа поддержана РНФ (Грант 14-14-00192)

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИПИДНЫХ ПРОФИЛЕЙ ЭКТОПИЧЕСКОГО И ЭУТОПИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИЯ.

© *Н.Л. Стародубцева,[1,2] В.В. Чаговец,[1] А.С. Кононихин,[1,2] А.В. Борисова,[1] А.О. Токарева,[2] В.Е. Франкевич,[1] Л.В. Адамян[1]* [1]ФГБУ НЦАГиП им. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, [2]Московский физико-технический институт (Государственный университет), Долгопрудный, Московская обл. *aurum19@mail.ru*

Исследование направлено на разработку стратегии ранней диагностики и прогнозирования течения гиперпролиферативных гинекологических патологий (в частности, эндометриоза) на основе липидомных подходов. Образцы тканей эндометрия (эктопического и эутопического) от 30 пациенток были получены при лапароскопии по поводу эндометриоза III-IV степени распространения в ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Экстракции липидов по Фолчу с последующим анализом на масс-спектрометре Maxis Impact (Bruker, Германия).
В результате, методом label-free был определен уровень 148 метаболитов в эндометрии. Фосфатидилэтаноламин (PE O-20:0), сфингомиелин (SM 34:1), диглицерид (DG 44:9), фосфатидилхолины (PC 32:1, PC O-36:3, PC 38:7, PC 38:6, PC 40:8, PC 40:7, PC 40:6, PC O-42:1) и триглицериды (TG 41:2, TG 49:4, TG 52:3) обнаружили достоверные различия в образцах эктопического и эутопического эндометрия. Фосфатидилхолины (PC 32:1, PC O-36:3, PC 38:7, PC 38:6, PC 40:8, PC 40:7, PC 40:6, PC O-42:1) и сфингомиелин SM 34:1 могут быть предложены как возможные биомаркеры эндометриоза, так как липиды этих классов играют ключевую роль в супрессии апоптоза.

Исследования были выполнены при поддержке гранта № 16-14-00029 РНФ и частично (идентификация липидов) грантом Министерства образования Российской Федерации №МК-8484.2016.7.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА БЛИЖНЕ-ИНФРАКРАСНЫХ МАРКЕРОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФИТОХРОМОВ.

© *Олеся В. Степаненко, Ольга В. Степаненко, И.М. Кузнецова, К.К. Туроверов.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, lvs@incras.ru

Флуоресцентные методы являются незаменимыми для решения фундаментальных задач клеточной и молекулярной биологии, таких как прижизненная визуализация процессов, происходящих в отдельных клетках и в целом организме с высоким разрешением в реальном масштабе времени. Развитие методов флуоресцентной микроскопии опирается, в том числе, на создание и постоянное усовершенствование белковых флуоресцентных маркеров (FPs). Маркеры, созданные на основе бактериальных фитохромов, использующие в качестве хромофорной группы биливердин (BV), имеют на сегодняшний день наиболее длинноволновые спектры поглощения и флуоресценции, попадающие в ближне-инфракрасную (NIR) область спектра, где биологические ткани обладают наибольшей прозрачностью.

Было выполнено исследование флуоресцентных свойств димерных NIR FPs iRFP670, iRFP682 и iRFP713 и мономерного BphP1-FP и их мутантных форм, имеющих цистеиновые остатки, способные связывать BV, как в PAS так и GAF доменах (Cys 15 и Cys 256, соответственно), имеющие цистеиновые остатки только в одном из этих доменов, и не имеющие цистеиновых остатков Cys 15 и Cys 256. Было показано, что на флуоресцентные свойства и стабильность NIR FPs существенное влияние оказывают аллостерические взаимодействия между доменами и мономерами белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-01515).

ФОЛДИНГ БЫЧЕГО ОДОРАНТ-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА В УСЛОВИЯХ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА.

© *Ольга В. Степаненко,*[1] *Олеся В. Степаненко,*[1] *И.М. Кузнецова,*[1] *К.К. Туроверов.*[1,2] [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
sov@incras.ru
[2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург.

Бычий одорант-связывающий белок (bOBP) формирует уникальную димерную структуру посредством «обмена доменами», при этом каждая мономерная субъединица bOBP формирует классическую для OBP укладку при взаимодействии его β-бочонка с α-спиральным участком другой мономерной субъединицы. Исследование процессов разворачивания–сворачивания β-обогащенных белков актуальны как для фундаментальной науки в связи с решением вопроса фолдинга белков, так и в связи с возможностью конструирования на основе OBP чувствительного элемента оптических биосенсорных систем на опасные вещества. На процессы фолдинга белков в клетке существенное влияние оказывает доступный объем, в связи с чем исследования этих процессов в условиях макромолекулярного краудинга являются высокоприоритетными.
Были исследованы процессы разворачивания – сворачивания bOBP в условиях, имитирующих густонаселенную клеточную среду. В качестве краудинг агента использовали полиэтиленгликоль (ПЭГ) различной молекулярной массы и концентрации. Показано, что ПЭГ приводит к стабилизации bOBP и способствует образованию нативного димерного состояния белка даже в отсутствие денатурирующих условий. Эффект краудинг агента зависит от его молекулярной массы и концентрации.

ВЛИЯНИЕ РЕСВЕРАТРОЛА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ.

© *И.И. Суворова.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
irsuvorov@yandex.ru

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) обладают двумя важными свойствами: плюрипотентностью – способностью образовывать все типы тканей взрослого организма, и самообновлением. Эти уникальные свойства делают ЭСК перспективным инструментом клеточной терапии, включая ксенотрансплантацию и

моделирование различных заболеваний. Ресвератрол является природным соединением, обнаружившим ряд положительных свойств на различных модельных объектах. Было показано, что ресвератрол обладает противоопухолевым, противовоспалительным, нейропротекторным, антиоксидантным, кардиопротекторным действиями. Все эти свойства делают возможным предполагать, что ресвератрол может положительно влиять на выживаемость ЭСК, способствуя их генетической стабильности. В связи с этим мы решили исследовать жизнеспособность ЭСК мыши при действии ресвератрола. С помощью теста МТТ и построения кривых роста мы провели подбор рабочей концентрации ресвератрола для обработки ЭСК мыши и оценили пороговые концентрации этого агента. Было показано, что оптимальной рабочей концентрацией ресвератрола является 10 мкг, в то время как использование более высоких концентраций этого агента приводит к выраженному цитотоксическому эффекту. Каспазный анализ показал, что ресвератрол в различных концентрациях от 5 до 50 мкг индуцирует в ЭСК мыши апоптоз. Таким образом, при повышенной концентрации больше 10 мкг ресвератрол вызывает заметную гибель ЭСК мыши, поэтому оптимальными концентрациями ресвератрола в работе на ЭСК мыши были выбраны 5 мкг и 10 мкг. Согласно данным вестерн блотинга и трансфекции с использованием плазмиды pG13Luc, несущей 13 копий ДНК-связывающих участков белка p53, индукция апоптотической активности может быть связана с увеличением транскрипционной активности белка p53 в ЭСК мыши при действии ресвератрола. С помощью проточной цитофлуориметрии было обнаружено, что ресвератрол вызывает незначительные изменения в профиле клеточного цикла ЭСК мыши, слегка увеличивая количество клеток в фазе S. Предварительная обработка ЭСК мыши ресвератролом и последующее добавление в среду H_2O_2 приводит к увеличению выживаемости этих клеток в условиях окислительного стресса. Таким образом, можно заключить, что ресвератрол в концетрации выше 10 мкг обладает цитотоксическим эффектом, в то время как в концетрации менее 10 мкг способствует выживаемости этих клеток в условиях окислительного стресса.

СПОСОБНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА АККУМУЛИРОВАТЬ NH_4^+/NH_3 ОБЕСПЕЧИВАЕТСЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СОПРЯЖЕННОСТЬЮ АММОНИЙНОГО И АНИОННОГО ТРАНСПОРТЕРОВ.

© *Ю.С. Судницына [1], Е.Р. Никитина [1], И.А. Добрылко [1], А.И. Кривченко [1], С.П. Гамбарян [1,2], И.В. Миндукшев [1]* [1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, iv_mindukshev@mail.ru
[2]Кафедра цитологии и гистологии Биологического факультета СПБГУ, г. Санкт-Петербург

Гликопротеин RhAG осуществляет перенос аммиака/аммония (NH_3/NH_4^+) в эритроцитах человека и формирует структурный комплекс с анионным транспортером (AE1). На данный момент крайне мало известно, как о функциональной взаимосвязи этих транспортеров, так и о кинетике реакции. В данной работе мы исследовали кинетику NH_3/NH_4^+ транспорта и выдвинули предположение о функциональной взаимосвязи RhAG и AE1.

Влияние внеклеточного pH, концентрации HCO_3^-, температуры и активности AE1 на начальную скорость увеличения объема эритроцитов оценивалось с помощью метода малоуглового светорассеяния (анализатор LaSca-TM). В условии аммонийной нагрузки до начала гемолиза динамика изменения интенсивности светорассеяния под углом 1° совпадает с динамикой изменения среднего объема клеток (MCV). В связи с этим, скорость входа NH_3/NH_4^+ в клетку косвенно может быть оценена по скорости увеличения интенсивности сигнала (на основании изменения начальной скорости увеличения объема клеток - V_i). Изменение объема и внутриклеточного pH (BCECF-AM) исследовалось методом проточной цитометрии. Активность AE1 ингибировали с помощью DIDS.

Мы показали, что транспорт NH_3/NH_4^+ зависит от изменений внеклеточного pH (pH оптимум 7.4±0.1), температуры (Q_{10} 2.6±0.3),

концентрации HCO_3^- (EC_{50} 4.7±0.3мМ) и активности AE1. В изотонической аммонийной среде NH_4^+/NH_3 в концентрации от 100мМ до 140мМ приводил к гемолизу, в то время как ингибирование функции AE1 полностью предотвращало лизис эритроцитов. В изотонической аммонийной среде в присутствии 25мМ HCO_3^- (37°C) начальная скорость увеличения объема возрастала до 50 раз в сравнении с той же средой без HCO_3^-.

Полученные результаты позволили заключить, что транспорт NH_3/NH_4^+ зависит от температуры и внеклеточного pH, что свидетельствует об определяющей роли белков-транспортеров в транспорте NH_3/NH_4^+, а не простой диффузии NH_3 через мембрану. Зависимость скорости реакции от концентрации HCO_3^- и активности AE1 подтверждает функциональную взаимосвязь RhAG и AE1 транспортеров эритроцитов человека. Кроме того, мы показали, что pH_i достигает максимальных значений быстрее, чем увеличение объема, что говорит об отсутствии прямой корреляции между входом NH_3/NH_4^+ и изменением pH_i. Таким образом, можно заключить, что совместное функционирование AE1 и RhAG позволяет эритроцитам аккумулировать и переносить NH_3/NH_4^+, тем самым поддерживая физиологическую концентрацию NH_3/NH_4^+ в крови.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-04-00632 и средствами государственного бюджета по госзаданию на 2013-2017 годы №г.р. 01201351572.

Исследования методом проточной цитометрии выполнены на базе ЦКП ИЭФБ РАН.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТИОФЛАВИНА Т С АМИЛОИДНЫМИ ФИБРИЛЛАМИ НА ОСНОВЕ SUP35P.

© *А. И. Сулацкая,[1] Н. П. Родина,[1,2] М. В. Белоусов, [3] С. А. Бондарев,[3] Г. А. Журавлева,[3] И. М. Кузнецова,[1] К. К. Туроверов.[1,2]*

[1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ansul@mail.ru

[2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, [3]Санкт-Петербургский государственный университет.

Прионные болезни относятся к классу нейродегенеративных заболеваний и, в большинстве случаев, приводят к летальному исходу. Как и другие заболевания, связанные с нарушением фолдинга белков центральной нервной системы, прионные болезни проявляются быстро прогрессирующим расстройством рефлексов конечностей, гипотензией, дизартрией, нарушением глотания, атаксией, снижением функциональной активности головного мозга и деменцией. Одним из наиболее изученных прионов на сегодняшний день является [PSI+], который возникает в результате прионизации дрожжевого белка Sup35p. Несмотря на длительную историю исследований, многие вопросы, касающиеся структурной организации фибрилл на основе Sup35p, остаются неизученными. Оценка параметров связывания с этими амилоидными фибриллами специфического флуоресцентного зонда тиофлавина Т (ThT) может внести значительный вклад в эту область.

В настоящей работе для решения этой задачи была использована абсорбционная спектроскопия растворов, подготовленных методом равновесного микродиализа. Было показано существование двух мод связывания красителя с фибриллами с существенно различающимися аффиннностью и стехиометрией связывания, а также квантовым выходом флуоресценции связанного красителя. Нужно отметить, что применение предложенной методики является ключевым моментом, так как флуоресцентный подход, широко используемый для определения параметров связывания, не может быть применен в случае существования нескольких мод связывания, а значит, не может дать корректных результатов при изучении взаимодействия ThT с фибриллами на основе Sup35p.

Существование одной из обнаруженных мод связывания может быть обусловлено встраиванием красителя в бороздки вдоль оси волокна фибриллы перпендикулярно β-листам. Наличие еще одного типа связывания с более высокой аффинностью, меньшим числом мест связывания и более высоким квантовым выходом флуоресценции связанного ThT может быть обусловлено локализацией молекул красителя в участках кластеризации фибрилл, наличие которых было показано с

использованием метода электронной микроскопии.

Нужно отметить, что при заболеваниях, сопровождающихся различного рода амилоидозами (в т.ч. при прионных болезнях), наблюдается образование нерастворимых депозитов, оседающих (откладывающихся) в органах и тканях. Этот факт имеет существенное значение в связи с широким использованием ThT в качестве диагностического, а в перспективе, и терапевтического агента при таких заболеваниях. Можно предположить, что *in vivo* будет преобладать взаимодействие ThT именно с кластерами амилоидных фибрилл, а значит при проведении экспериментов *in vitro* характеристике этого типа взаимодействия должно быть уделено особое внимание.

Работа выполнена при поддержке Программы "Молекулярная и клеточная биология" РАН, грантов РФФИ 16-54-00230_Бел, 16-04-01614_а и стипендии Президента РФ СП-1982.2015.4.

ЛЕЧЕНИЕ КРЫС С ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА ИНТРАНАЗАЛЬНЫМИ ИНСУЛИНОМ И СЕРОТОНИНОМ ВОССТАНАВЛИВАЕТ У НИХ ГИПОТАЛАМИЧЕСКУЮ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНУЮ СИГНАЛЬНУЮ СИСТЕМУ.

© *И.Б. Сухов, К.В. Деркач, О.В. Чистякова, А.О. Шпаков*. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, suhov_ivan88@mail.ru.

Одной из причин метаболических нарушений, возникающих при сахарном диабете 2-го типа (СД2), а также осложнений этого заболевания являются функциональные изменения в инсулиновой и серотониновой системах гипоталамуса. Эти изменения во многом обусловлены снижением уровня инсулина и серотонина в ЦНС. Повышение уровня инсулина и серотонина в ЦНС должно способствовать восстановлению инсулиновой и серотониновой систем в гипоталамусе и может рассматриваться как один из подходов для предотвращения осложнений СД2 и нормализации энергетического гомеостаза. Цель работы состояла в изучении влияния пятинедельного лечения крыс с неонатальным СД2 интраназальными инсулином (ИИ) (0.48 МЕ/крысу/сутки) и серотонином (ИС) (20 мкг/крысу/сутки) на метаболические показатели и активность аденилатциклазы (АЦ) в гипоталамусе. Лечение диабетических крыс ИИ нормализовало толерантность к глюкозе и ее утилизацию. ИС в этом отношении был менее эффективным. Лечение ИИ и ИС также восстанавливало активность гипоталамической меланокортиновой системы, повышая уровень экспрессии гена *Mc4r* для МК4-меланокортинового рецептора и усиливая стимулирующий АЦ эффект МК4-агонистов. При этом повышалась экспрессия гена *Htr1b* для 5-HT_{1B}-серотонинового рецептора и восстанавливались ингибирующие АЦ эффекты 5-HT_{1B}-агонистов. Лечение ИИ и ИС меняло соотношение экспрессии генов, кодирующих D1- и D2-дофаминовые рецепторы (*Drd1*, *Drd2*), в пользу *Drd2* и восстанавливало ингибирующий АЦ эффект D2-агонистов. Таким образом, лечение ИИ и ИС крыс с СД2 восстанавливало чувствительность АЦ гипоталамуса к МК4-агонистам и моноаминам, что является одним из механизмов их действия на энергетический обмен и инсулиновую резистентность.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (проект 14-15-00413).

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ HU-БЕЛКИ: СТРУКТУРА, ФУНКЦИЯ, ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

© *В.И.Тимофеев*[1,2], *К.М.Бойко*[2,3], *Т.В.Ракитина*[2,4], *Ю.К.Агапова*[2], *Д.Э.Камашев*[2], *Д.А.Корженевский*[2]. [1]ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, tostars@mail.ru
[2]НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, [3]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, [4]Институт биоорганической химии РАН, Москва

В бактериях белки, ассоциированные с нуклеоидом (NAPs – nucleoid associated proteis), представляют одну из самых больших групп регуляторов, которые контролируют, хромосомную архитектуру и различные виды операций, связанных с ДНК, такие как репликация, транскрипция, рекомбинация и

репарация. Особую роль среди NAPs играет гистоноподобный белок HU, который присутствует во всех бактериях, тогда как качественный и количественный состав других NAPs может варьировать. У простейших микроорганизмов, например, у паразитических бактерий класса микоплазм HU-белок является единственным NAP.

HU-белки - это небольшие (порядка 10 кДа) положительно заряженные белки, образующие гомо- или гетеродимеры и регулирующие различные аспекты жизнедеятельности бактерии, причём конкретный репертуар функций HU-белка зависит от специфического набора других NAPs. Нокаут генов, кодирующих HU-белки, приводит к подавлению роста бактерий и нарушению их способности противостоять стрессу, а при отсутствии других NAPs - к гибели. HU-белки связывают двухцепочечную ДНК не специфично, но имеют повышенное сродство к различным видам репликативных структур и поврежденной ДНК. Несмотря на то, что первичная и пространственная структура белков исключительно консервативна, репертуар наиболее предпочтительных ДНК субстратов и размер сайта связывания варьируют. HU-белки также отличаются по своей способности противостоять тепловой денатурации. Всё это делает HU-белки хорошей моделью для изучения структурных основ специфичности ДНК связывания или термостабильности. Интересу структурных биологов к данному объекту способствует то, что HU-белки хорошо экспрессируются в *E. Coli* и могут быть закристаллизованы, а благодаря своему маленькому размеру являются удобным объектом для изучения методом ЯМР спектроскопии.

Отсутствие гомологов HU-белка у человека делает его потенциальной мишенью для разработки нового поколения антибактериальных препаратов. В 2014 было впервые показано, что найденный методом виртуального скрининга ингибитор ДНК-связывающей активности HU-белка из *M.tuberculesis* способен тормозить рост бактерии. Очевидно, что влияние подобных ингибиторов на микроорганизмы, в которых HU-белок является единственным NAP, будет более эффективным. Поэтому в течении нескольких лет используя методы РСА и ЯМР мы занимались структурными исследованиями микоплазменных HU-белков. Полученные данные позволили установить структурные основы термостабильности HU-белка из *S. melliferum*, а также разработать низкомолекулярные ингибиторы эффективно подавляющие рост микоплазмы в культуре.

Данная работа проводится при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 15-14-00063).

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ДОМЕНА ТЕЛОМЕР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА TRF2

© *Травина А.О.*[1], *Ильичева Н.В.*[2]. [1] Факультет химической и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного технологического института, alotra1@yandex.ru
[2] Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Изучение взаимодействия теломер с ядерной мембраной необходимо для понимания процессов естественного клеточного старения и некоторых молекулярных аспектов развития прогерии. Вероятно, за взаимодействие теломер с ядерной мембраной отвечает домен белка TRF2 с неизвестными функциями.
Целью настоящей работы является создание методики для получения полипептида, соответствующего домену TRF2 с неизвестными функциями, в количествах, достаточных для дальнейших экспериментов и достаточной чистоты для создания антител.
Экспрессию полипептида проводили с помощью бактериального штамма-продуцента (*E. coli* RosettaBlue (DE3)-pET32a-udTRF2). Экспрессию индуцировали добавлением 0,4 мМ IPTG. Бактериальные клетки разрушили, для выделения полипептида использовали растворимую фракцию клеточного лизата. Были подобраны условия выделения целевого полипептида методами осаждения сульфатом аммония и ионообменной хроматографии. Целевой полипептид выделили из водного экстракта комбинацией этих методов. Концентрация целевого полипептида в

полученном растворе – 0,25 мг/мл, чистота – 90%.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», грантов РФФИ (проекты № 15-04-01857 и 16-34-00714 мол_а) и РНФ (проект № 15-15-20026).

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАЦИОННОГО ОТВЕТА В КЛЕТКАХ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ СЕККЕЛЯ.

© *А.С. Туренко*[1], *И.М. Спивак*[1,2]. [1]Биологический факультет Санкт-Петербургского Государственного Университета
anastasiiaturenko@gmail.com
[2]Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург

Синдром Секкеля 1(CC1, OMIM:210600) является тяжелыми наследственными аутосомно-рецессивным заболеванием, развивающееся при наличии мутаций в генах протеинкиназы ATR. Протеинкиназа ATR является одним из ключевых участников глобального клеточного ответа на повреждения ДНК и имеет спектр белков-мишеней. Для работы были взяты полученные в лаборатории радиационной цитологии ИНЦ РАН линии первичных фибробластов Ss1SP (пациента с CC1). В качестве контроля использовали первичные фибробласты здорового донора VH-10. В данной работе была установлена динамика репарационного ответа на повреждения ДНК, вызванные ионизирующим излучением (2 Гр). С помощью методов непрямой иммуногистохимии было показано нарушение процессов репарации ДНК в клетках пациента с сидромом Секкеля выражающееся в задержке формирования и эллиминации фокусов γH2AX, являющихся маркерами повреждения ДНК и фокусов p53BP1, являющимися маркерами репаративных комплексов.

ЭКСПРЕССИЯ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ В ПЕРВИЧНОЙ МОНОАСТРОЦИТАРНОЙ КУЛЬТУРЕ.

© *С. А. Тутукова, Н. В. Пономарева, Е. В. Митрошина, Т. А. Мищенко, М. В. Ведунова, А. А. Бабаев.* Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, tutukova.sveta@yandex.ru.

Вирусные векторы – специализированные молекулярные конструкты, эффективно транспортирующие ген-интереса в клетки. В исследовании использовали вирусные конструкты AVV-GFAP-ChR2-Venus и AVV-GFAP-Case12, сконструированные под астроцитарном промотором GFAP. AVV-GFAP-ChR2-Venus состоит из мембранного белка Channelrhodopsin2 (ChR2) слитого с флуоресцентным белком Venus (Ex/Em 515/528). ChR2 под воздействием синего света активируется, пропуская ионы Na в клетку. AVV-GFAP-Case12, содержит Case12 - генетически-кодируемый флуоресцентный биосенсор, позволяющий анализировать колебания внутриклеточной концентрации ионов кальция.

В данной работе проводили амплификацию вирусных векторов в культуре клеток HEK 293FT. Вирусы были очищены и концентрированы на колонках Amicon ultra-15. Первичные моноастроцитарные культуры получены из коры мышат p0-p2. Культуры инфицировались на 10 день культивирования. Экспрессия вирусных векторов была зафиксирована на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Karl Zeiss 510 LSM на 5 день культивирования.

Таким образом, удалось зафиксировать экспрессию вирусных векторов AVV-GFAP-ChR2-Venus и AVV-GFAP-Case12 в первичной моноастроцитарной культуре. Наработанные и тестированные вирусы планируется использовать в экспериментах in vivo на лабораторных животных.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ОКСИТОЦИНОМ ИЗМЕНЕНИЯ В ЯДРАХ ЛАКТОЦИТОВ МЫШЕЙ НЕ ЗАВИСЯТ ОТ УРОВНЯ ПРОЛАКТИНА

© *К.В. Тютина,*[1,2] [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [2]Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины
tkv3435@mail.ru

К настоящему времени накоплено значительное количество данных о роли пролактина и окситоцина в процессах регуляции маммогенеза и лактопоэза, однако эффекты данных гормонов на уровне субъядерных структур лактоцитов, остаются практически неизученными. Целью настоящей работы являлся анализ действия окситоцина на структурно-функциональное состояние хроматина в ядрах секреторных клеток молочной железы лактирующих мышей и зависимость этих эффектов от уровня пролактина. Окситоцин вводили внутрибрюшинно в дозе 0.5 МЕ. Для снижения уровня пролактина использовали бромокриптина мезилат, который вводили внутрибрюшинно в дозе 0.45 мг в течение 7 сут. В ядрах лактоцитов молочных желез до и после (через 5 и 10 мин) введения окситоцина на светооптическом и ультраструктурном уровне анализировали распределение хроматина, хроматин-ремоделирующего белка ATRX, а также маркера транскрипционно репрессированного хроматина – гистона H3, триметилированного по лизину в 9 положении (H3me3K9). Визуальные наблюдения на светооптическом уровне были дополнены фотометрическим анализом цифровых изображений. Обнаружено, что окситоцин индуцирует значительное перераспределение хроматина и ATRX. Через 5 мин после введения окситоцина уменьшается число областей гетерохроматина, а распределение ATRX приобретает более диффузный характер, уменьшается число относительно крупных зон скопления этого белка. Для H3me3K9, напротив, через 5 мин после инъекции окситоцина выявлено снижение интенсивности диффузного мечения нуклеоплазмы. Аналогичные изменения наблюдаются в лактоцитах мышей, получавших бромокриптин. Таким образом, окситоцин приводит к выраженным морфофункциональным перестройкам хроматина в ядрах лактоцитов, возможно, связанным с кратковременной активацией транскрипции, при этом внутриядерные эффекты окситоцина не зависят от уровня пролактина.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА АФФИННОЙ ОЧИСТКИ ЭКЗОСОМ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕМБРАННОГО МАРКЕРА CD63.

© *И. А. Федоров,*[1, 2] *А. С. Цимоха.*[2]
[1]Биологический факультет Санкт-Петербургского Государственного Университета
ivan00fedorov@gmail.com
[2]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Экзосомы – небольшие органеллы, диаметром 40 – 100 нм. В отличие от других экзовезикул, экзосомы формируются внутри других мембранных органелл, называемых мультивезикулярными тельцами. Экзосомы представляют значительный интерес для ученых, как активные участники межклеточной коммуникации. В организме человека экзосомы участвуют в транспорте не только ряда белков, но и функциональных мРНК, миРНК и ДНК, задействованы в патогенезе раличных заболеваний, в том числе рака. В настоящее время экзосомы рассматривают в качестве средства доставки терапевтических агентов, как для иммунной или лекарственной терапии, так для терапии с помощью РНК-интерференции.

При выделении экзосом чаще всего используют ступенчатое центрифугирование, включая фильтрацию и ультрацентрифугирование. Использование такого метода, однако, не гарантирует отсутствие в выделенном объеме экзосом других экзовезикул сходного размера. Разработанный нами метод очистки экзосом позволит решить эту проблему, поскольку основан на аффинной очистке этих везикул за биотин-связывающую последовательность, слитую со специфическим маркером экзосом - белком CD63. CD63, как и другие представители семейства мембранных белков тетраспанинов, содержит 4 трансмембранных домена, и оба его конца находятся внутри везикулы. Поэтому мы создали

рекомбинантный CD63 с дополнительным трансмембранным доменом, выводящим во внешнее пространство полипептид, используемый для аффинной очистки. В составе полипептида находится сайт для расщепления TEV-протеазой, биотин-связывающая последовательность и последовательность шести гистидинов. Путем вирусной трансдукции, была получена клеточная линия на основе клеток человека HeLa, стабильно экспрессирующая такой модифицированный CD63. Мы показали, что модифицированный CD63 покидает клетку в составе экзовезикул, что позволило нам аффинно очистить экзосомы из кондиционированной клетками среды путем последовательного связывания со стрептавидиновым носителем и элюции, производимой после расщепления полипептидной цепи TEV-протеазой. Таким образом, разработанный нами селективный метод очистки экзосом от других представителей гетерогенной популяции внеклеточных везикул позволит получать чистый препарат экзосом для их использования в терапевтических целях и дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (16-14-10343).

ЯДЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ NR4A1 И NR4A3 УСИЛИВАЮТ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩИМ АГЕНТАМ

© Федорова О.А.[1], Шувалов О.Ю.[1], Петухов А.В.[1], Дакс А.А.[1], Васильева Е.А.[1], Барлев Н.А.[1] 1 - Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
fedorovaolgand@gmail.com,

Семейство ядерных рецепторов, являющихся ДНК-связывающими транскрипционными факторами, относится к наиболее распространенным регуляторам экспрессии генов у высших эукариот. Поэтому влияние ядерных рецепторов на патогенез различных заболеваний, включая злокачественные новообразования, активно изучается. Известно, что ядерный рецептор NR4A1 способствует повышению потенциала метастазирования при раке молочной железы, а также подавляет экспрессию проапоптотического гена Bax при воздействии ДНК-повреждающего агента доксорубицина и, таким образом, опосредует резистентность раковых клеток. Целью данной работы было изучить влияние экспрессии ядерных рецепторов NR4A1 и NR4A3 на резистентность к ДНК-повреждающим агентам: доксорубицину и цисплатину. Для этого были использованы клеточные линии рака молочной железы MDA-MB-231 и MDA-MB-468 с разным статусом экспрессии генов NR4A1 и NR4A3. С помощью колориметрического MTT-теста оценивали количество жизнеспособных клеток после обработки клеточных линий MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ДНК-повреждающими агентами доксорубицином и цисплатином в различных концентрациях. Кроме того, для детекции клеток, подвергшихся апоптозу, использовали флуоресцентный метод анализа апоптоза по связыванию аннексина V (набор Annexin-V-FITC). В нашей работе было показано, что как NR4A1, так и NR4A3 влияют на резистентность к ДНК-повреждающим агентам доксорубицину и цисплатину.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ: 14-15-00816, Программы МКБ при Президиуме РАН и РФФИ (16-34-60228 мол_а_дк и 16-34-00869 мол_а).

КАНАЛООБРАЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИЕНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ.

© *С. Г. Фоменко[1,2], С. С. Ефимова[1].* [1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
sonya-rsh@ya.ru
[2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

Полиеновый антибиотик амфотерицин Б (АМБ) является одним из самых известных и наиболее эффективных противогрибковых агентов. Показано, что в основе фунгицидного действия АМБ лежит образование водных пор. Однако его применимость ограничена выраженными побочными эффектами, такими как нефротоксичность, тошнота, рвота, коликообразная боль в кишечнике, анемия, сердечная аритмия и аллергические реакции

[Hamilton-Miller, Bacteriolog. Rev., 1973; Craven and Gremillion, Antimicrob. Agents Chemother., 1985; Bolard et al., Biochim. Biophys. Acta., 1991]. Поэтому одной из актуальных задач современной фармакохимии является увеличение каналообразующей активности антибиотика в результате химической модификации в структуре макролида, что позволит снизить риск побочных эффектов.

Цель работы - установление способности новых полусинтетических антибиотиков на основе полиенового макролида амфотерицина Б и бор-содержащих антибиотиков формировать в липидных бислоях, моделирующих мембраны грибковых клеток, ион-проницаемые нанопоры.

Полусинтетические производные АМБ (LCTA) были получены в лаборатории химической трансформации антибиотиков в НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе [Tevyashova et al., J. Antibiotics, 2016].

Проведены электрофизиологические измерения проводимости и времени жизни одиночных каналов, образованных полусинтетическими производными амфотерицина Б с различными радикалами в C_{16} и C_{19} положениях, в эргостерин-содержащих липидных мембранах.

В работе показано, что полусинтетические производные амфотерицина Б с амидной и бензоксобаральной заменами в C_{16} и C_{19} положениях, соответственно, образуют одиночные ионные каналы в эргостерин-содержащих липидных бислоях. Проводимость пор, образованных LCTA, варьирует в зависимости от вида радикала. Введение в структуру АМБ метильной, эфирной или амидной группы в C_{16} группе, а также бор-содержащего производного в C_{19} положение АМБ приводит к увеличению проводимости каналов на 35 ± 5 %. Одновременная замена в C_{16} и C_{19} положениях слабо изменят проводимость каналов (максимальное увеличение проводимости каналов не более 10 %). Измерение времени жизни каналов, образованных различными LCTA, показало, что последние находятся в открытом состоянии в два-три раза меньше АМБ пор.

Анализ полученных результатов позволил выдвинуть предположения о том, что наблюдаемые различия в характеристиках ионных каналов является результатом меньшей стабильности образующих трансмембранную пору комплексов LCTA-эргостерин по сравнению с АМВ-эргостерин и бóльшем размере каналов, образованных изучаемыми полусинтетическими производными.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 14-14-00565) и Программы Президента РФ (СП-69-2015.4).

ВЛИЯНИЕ ПРЕДДЕНАТУРАЦИОННЫХ КОНЦЕТРАЦИЙ ГУАНИДИН-ГИДРОХЛОРИДА НА АФФИННОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ ГЛЮКОЗЫ С D-ГЛЮКОЗА/D-ГАЛАКТОЗА-СВЯЗЫВАЮЩИМ БЕЛКОМ

© *А.В. Фонин*[1] [1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, alexfonin@incras.ru

Взаимодействие D-глюкоза/D-галактоза-связывающего белка (GGBP) с его лигандами сопровождается существенным изменением структуры белка. Поэтому изучение конформационных изменений GGBP при различных внешних условиях существенно для понимания механизмов фолдинга и функциональной активности этого белка. В настоящей работе исследованы структурные изменения мутантной формы GGBP/H152C с присоединенным флуоресцентным красителем BADAN и белка дикого типа в растворах гуанидингидрохлорида (GdnHCl) и мочевины. Показано, что в области предденатурационных концентраций GdnHCl (до 0.2 М) наблюдается смещение равновесия между конформерами GGBP/H152C в сторону более компактных форм белка, активный центр которых более комплементарен структуре лиганда. Это должно вызывать увеличение скорости и аффинности связывания белка с сахаром. Методами флуоресцентной спектроскопии и калориметрии изотермического титрования это предположение было подтверждено для мутантной формы GGBP/H152C и белка дикого типа. Предденатурационные концентрации мочевины не оказывают такого эффекта на функциональную активность GGBP и GGBP/H152C. Полученные данные

позволили заключить, что действие малых концентраций GdnHCl на структуру и функциональную активность GGBP аналогично действию нейтрализующих осмолитов – веществ, основной функцией которых является компенсация дестабилизирующего действия стрессовых факторов за счет значительного увеличения стабильности и функциональной активности белков.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-24-00131). А.В.Ф. является стипендиатом Президента РФ (СП-1725.2015.4).

ВЛИЯНИЕ РАСТВОРИМОЙ ФОРМОЙ ДГК НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЯ С РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМОЙ ЭРЛИХА.

© *А. А. Хлебущева,*[1] *А. А. Наумов,*[2,3] *М. М. Поцелуева.*[2,3] [1]Кубанский государственный университет, Краснодар
nasstyboo@mail.ru
[2]Пущинский естественно-научный институт, [3]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино.

В настоящее время наблюдается увеличение интереса к дигидрокверцетину (ДГК) как биологически активному веществу, обладающему антиоксидантными, противовоспалительными и регенерирующими свойствами. При этом применение ДГК ограничено его малой растворимостью в воде. Включение ДГК в комплекс с β-циклодекстрином позволяет значительно повысить его растворимость и расширить сферы его применения. Целью данной работы являлось исследование влияния времени начала терапии опухоли комплексом дигидрокверцетин-β-циклодекстрин (рДГК) на продолжительность жизни опухоленосителя. В качестве модельной опухоли была выбрана асцитная карцинома Эрлиха, трансплантированная в брюшную полость мышей. Препарат рДГК вводили в брюшную полость, в дозе 50 мг/кг. Установлено что применение рДГК приводит к увеличению продолжительности жизни опухоленосителя. Причём наибольший эффект (до 30%) препарат оказывал при терапии, начатой в конце латентной и начале экспоненциальной фазы опухолевого роста, т.е. на 5-6 сутки развития опухоли. При этом продолжительность жизни опухолностителей коррелирует со снижением окислительного стресса за счет увеличения количества не окислённых тимоловых групп белков как в плазме, так и асцитной жидкости.

Работа поддержана грантом Минобрнауки № 2014/281.

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕКРЕТОРНЫХ БЕЛКОВ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ МИКРОСПОРИДИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SCFV-АНТИТЕЛ И ЭКСПРЕССИИ В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ SF9.

© А.А. Царев[1], С.А. Тимофеев[1], И.В. Сендерский[1], В.В. Долгих.
ФГБНУ Всероссийский институт защиты растений[1], Санкт-Петербург.
alexandretsarev@gmail.com.

Молекулярные механизмы взаимодействия паразитов на зараженную клетку в последние десятилетия активно исследуются у представителей Apicomplexa и Kinetoplastida. Сравнительно мало известно о влиянии на зараженную клетку микроспоридий – широко распространённых филогенетически близких к грибам внутриклеточных паразитов. Длительная адаптация микроспоридий к внутриклеточному паразитизму и факт того, что большинство представителей группы развивается в прямом контакте с цитоплазмой клетки-хозяина, предполагают активное участие секреторных белков паразита в управлении молекулярно-генетическими процессами зараженной клетки. Отсутствие данных о белках микроспоридий, секретируемых в зараженную клетку во многом обусловлено невозможностью их культивирования вне клетки хозяина и манипуляций с их геномом. В данном исследовании мы решили оценить возможность использования рекомбинантных одноцепочечных антител для изучения белков, секретируемых микроспоридией Paranosema locustae в цитоплазму зараженных клеток жирового тела перелетной саранчи. Скрининг

созданной библиотеки с помощью технологии фагового дисплея позволил отобрать несколько scFv-антител, специфично реагирующих с белками зараженного жирового тела саранчи, и приступить к их изучению. С целью моделирования процесса поступления секретируемых белков паразита в цитоплазму хозяина был использован метод их экспрессии без сигнального пептида в клетках насекомых линии Sf9. Анализ особенностей локализации экспрессируемых белков показал их сходное поведение в гетерологичных и естественно зараженных клетках насекомых.

Работа выполнена при поддержке
РФФИ (№ 15-04-04968-а).

СИНТАЗА СИСТЕМЫ QUORUM SENSING, КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ВИРУЛЕНТНОСТИ SERRATIA PROTEAMACULANS.

© *О.А. Цаплина.* ФГБНУ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
olga566@mail.ru

Бактерии рода *Serratia,* стойкие к стандартным методам стерилизации и дезинфекции, являются источником внутрибольничных инфекций. Однако механизмы вирулентности этих бактерий изучены недостаточно. Многие вирулентные факторы бактерий регулирует система Quorum Sensing (QS), отвечающая за индукцию определенного набора генов в ответ на повышение плотности популяции. Подавление системы QS может уменьшать степень патогенности бактерий для животных, однако данных о влиянии системы QS на инвазивную активность бактерий нет. Задачей работы было определить влияние инактивации гена синтазы SprI, основного участника системы QS (штамм любезно предоставлен сотрудниками лаборатории И.А.Хмель, ИМГ РАН), на известные факторы вирулентности и инвазивную активность бактерий *S. proteamaculans*. Мы показали, что инактивация гена SprI не влияет на известные факторы вирулентности: порообразующий токсин и внеклеточную протеазу серрализин. При этом инактивация системы QS усиливает способность к адгезии, что приводит к увеличению инвазивной активности бактерий в 2 раза. Кроме того, инактивация гена SprI приводит к потере активности протеазы протеализин, субстратом которой, по данным масс спектрометрии, может быть белок внешней мембраны OmpX. OmpX является гомологом QS регулируемого белка Rck *Salmonella*, способствующего адгезии бактерий. Таким образом, в отсутствии активности протеализина нерасщепленный белок OmpX может быть причиной увеличения адгезии и, в результате, инвазии бактерий с инактивированной системой QS.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-00316 и стипендией Президента Российской Федерации.

ДИСКРЕТНЫЕ ЕДИНИЦЫ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА И ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА РЕПЛИКАЦИИ ДНК У МЛЕКОПИТАЮЩИХ.

© *В.О. Чагин.* Санкт-Петербургский государственный университет, Институт цитологии, Санкт-Петербург, Россия, dr.chagin@mail.ru.

Своевременное удвоение генома и отсутствие при репликации ДНК генетических изменений, которые могут приводить к гибели или трансформации, являются важными условиями поддержания гомеостаза пролиферирующей клетки. Ядерная ДНК высших эукариот имеет сложную иерархию дискретных уровней организации. Доклад посвящен краткому обзору современных представлений о структурной организации генома и её связи пространственно-временной организацией репликации ДНК у млекопитающих на молекулярном и клеточном уровнях.

САМОРЕГУЛИРОВАНИЕ РАЗМЕРА МОЛЕКУЛ ГЛИКОГЕНА В ГЕПАТОЦИТАХ НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННОЙ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА.

© *А. Ю. Честнова*. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
chestnova.anna@gmail.com

Еще в 1958 году Мадсен и Кори показали, что по мере роста частицы гликогена остатки глюкозы на ее поверхности становятся всё более и более тесно прижатыми друг к другу. Авторы пришли к выводу о том, что размер молекулы гликогена регулируется особенностями ее собственной структуры. В данном случае вывод был сделан на основании результатов, полученных на гликогене, выделенном из ткани. В представленной работе обнаружены различия в структуре молекул гликогена непосредственно в гепатоцитах нормальной печени человека и пациентов с хроническим гепатитом (***ХГ***), циррозом печени (***ЦП***). Результаты были получены с применением флуоресцентной цитохимической PAS-реакции и метода FRET. Расстояние между цепями глюкозных остатков (***r***) в молекулах гликогена оценивали по эффективности FRET (E_{FRET}). В нормальной печени присутствует ~ 5 % гепатоцитов с глюкозными остатками, находящимися на 9-м и 10-м ярусах. При ***ХГ*** их доля составляет ~ 30 %, а при ***ЦП*** ~ 9 %, что приводит к повышению E_{FRET}. В гепатоцитах нормальной печени человека ***r*** составляет, в среднем, 6.14 ± 0.05 нм, при ***ХГ*** — 5.69 ± 0.04 нм, а при ***ЦП*** — 4.88 ± 0.02 нм ($p < 0.001$). По мере заполнения внешних ярусов молекул гликогена остатками глюкозы в гепатоцитах нормальной и патологически измененной печени человека, **r** уменьшается, причем в нормальной печени эта зависимость значительно более выражена, чем при ***ХГ*** и ***ЦП*** (**Δr** = 2.94, 2.03 и 0.55 нм соответственно). Таким образом, саморегулирование размера молекул гликогена при ***ЦП*** нарушено.

УРОВЕНЬ СТЕРОИДОВ В ЖИДКОСТИ ФОЛЛИКУЛОВ SUS SCROFA DOMESTICUS И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ООЦИТА.

© *И. В. Чистякова,*[1,2] *Т. И. Станиславович,*[2] *Т. И. Кузьмина,*[2] *В. П. Политов.*[2]
[1]ФГБОУ ВО СПбГАВМ, [2]ФГБНУ ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург
prof.kouzmina@mail.ru.

Женская гамета созревает in vivo в тесном взаимодействии со структурными элементами фолликула, продуктом секреции которых являются и стероиды. В фолликулах содержатся ооциты различные по функциональному статусу (ФС). Цель настоящего исследования – оценить гормональный статус фолликулов свиней, содержащих растущие (BCB^-) или завершившие фазу роста (BCB^+) ооциты. Для определения ФС ооцитов использовали краситель BCB (бриллиантовый кристаллический голубой, B-5388, концентрация - 13 µM, экспозиция - 90 минут), в результате воздействия которого ооплазма BCB^- ооцитов теряет окраску, а в BCB^+ ооцитах остается окрашенной (Egerszegi I. et al., 2010). Уровень тестостерона (Т) и эстрадиола (Э) определяли иммуноферментным анализом (фотометр STAT Fax 2100, набор реагентов фирмы «Хема»). Всего исследовано содержимое 485 фолликулов (жидкость из фолликулов d=3-6 мм и ооциты: 382 BCB^+ и 103 BCB^-). Установлены достоверные различия в содержании Т в жидкости фолликулов, содержащих BCB^+ или BCB^- ооциты (3,66±0,21 против 1,45±0,08, P<0,05, t-критерий Стьюдента), при определении концентрация Э достоверных различий не обнаружено (3,47±0,17 и 3,2±0,13).
Выявленные особенности могут быть использованы при моделировании состава сред для экстракорпорального дозревания ооцитов Sus Scrofa Domesticus при получении нативных или реконструированных эмбрионов.

ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ МЕХАНОТРАНСДУКЦИИ.

© *В.И. Чубинский-Надеждин, А.В. Сударикова, И.О. Васильева, Ю.А. Негуляев, Е.А. Морачевская.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
vchubinskiy@gmail.com

Механозависимые процессы являются неотъемлемой составляющей жизнедеятельности клетки, как в норме, так и при различных патологиях. Предполагается, что в клеточной механотрансдукции важную роль играют Ca-проницаемые катионные каналы, активирующиеся при растяжении (stretch) мембраны. С помощью метода патч-кламп мы исследовали биофизические свойства и механизмы регуляции стретч-активируемых катионных (SAC) каналов на

различных клеточных моделях. Показана роль липидного окружения и актинового цитоскелета в стретч-активации каналов. Получены данные, подтверждающие, что молекулярным коррелятом SAC каналов являются белки Piezo. Выявлен механизм, опосредующий участие SAC каналов в механотрансдукции и кальциевой сигнализации: локальный вход кальция через SAC каналы вызывал активацию колокализованных Ca-зависимых каналов, не обладающих механочувствительностью. Так, в трансформированных фибробластах 3T3B-SV40 обнаружено функциональное сопряжение между Ca-проводящими SAC каналами и Ca-активируемыми калиевыми каналами низкой проводимости (SK каналы). В то же время, в мезенхимных стволовых клетках вход кальция через SAC каналы стимулировал активность Ca-активируемых калиевых каналов высокой проводимости (BK каналы). Совокупность данных свидетельствует о присутствии функциональных кластеров механочувствительных и Ca-зависимых каналов, которые отличаются по молекулярному составу в различных типах клеток. Результаты демонстрируют вклад механочувствительных каналов в генерацию локального кальциевого ответа, вероятно, обеспечивающего специфичность передачи сигнала и формирование интегральных механозависимых реакций в нативных клетках.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ.

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СОСТАВ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ.

© *А. В. Шалыгин, А. Ю. Скопин, Д. О. Колесников, О. А. Зимина, Л. Н. Глушанкова, Е. В. Казначеева.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
a_shalygin@mail.ru.

Основной путь поступления кальция в электроневозбудимые клетки это депо-управляемые каналы, которые активируются кальциевыми сенсорами эндоплазматического ретикулума, белками STIM, при опустошении внутриклеточных депо. Существуют разные типы депо-управляемых каналов, в формировании которых участвуют белки семейства ORAI и TRPC. Организация и регуляция системы депо-управляемого входа остаются недостаточно изученными: отсутствует четкое сопоставление между вольт-амперными характеристиками и молекулярным составом каналов.
В работе использовался метод локальной фиксации потенциала в конфигурациях, позволяющих регистрировать токи через отдельные ионные каналы. В экспериментах с оверэкспрессией или подавлением экспрессии белков ORAI, STIM, TRPC мы охарактеризовали эндогенные каналы с проводимостью 17 пСм, образованные белками TRPC1 и активирующиеся белками STIM1 или STIM2; каналы с проводимостью 4,5 пСм, регулируемые белками STIM1 и TRPC3; высокоселективные каналы с проводимостью 1,2 пСм, регулируемые белком STIM2 и схожие по своим характеристикам с каналами, образованными белками ORAI.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантами Российского научного фонда (14-14-00720), Российского фонда фундаментальных исследований и стипендией Президента РФ (2009.2015.4).

ЦЕНТРОСОМА КАК ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ IN VITRO.

© *А.С. Шахов,*[1] *Р.Э. Узбеков,*[1,2] *И.Б. Алиева.*[3]
[1]Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета, [2]Медицинский факультет Университета Ф. Рабле, Тур, [3]НИИФХБ им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета
antshakhov@gmail.com

Монослой эндотелиальных клеток (ЭК) выстилает внутреннюю поверхность кровеносных сосудов и играет роль полупроницаемого селективного барьера, избирательно пропуская макромолекулы и форменные элементы крови. Цитоскелет ЭК играет ключевую роль в поддержании барьерной функции эндотелия. Первоначально ключевым фактором возникновения барьерной дисфункции считалось образование актиновых

стресс-фибрилл и последующее сжатие ЭК, приводящее к нарушению межклеточных контактов и образованию дефектов в эндотелиальном монослое. Позднее было показано, что система микротрубочек (МТ) активно вовлечена в реакцию ЭК на повреждающие воздействия, причем деполимеризация периферических МТ является начальным звеном в развитии дисфункции. Характерно, что в ЭК практически отсутствуют свободные МТ, а преобладают МТ, связанные с центросомой, располагающейся в геометрическом центре клетки. Результаты исследования поведения центросомы ЭК *in vitro* (как описанные в литературе, так и наши собственные) демонстрируют ее способность быстро реагировать на воздействия, отвечая выраженными морфологическими изменениями. Анализ активности центросомы в живых ЭК, проведенный в настоящей работе, позволяет предполагать активную вовлеченность центросомы в функциональную активность ЭК: центросома может влиять на количество динамичных концов МТ в районе межклеточных контактов.

Поддержано РФФИ (#15-04- 08550) и Программой развития МГУ (PNR 5.13.).

ИНТЕГРИРОВАННЫЕ СИГНАЛЫ ЯДЕРНОЙ И ЯДРЫШКОВОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ.

© *Е. В. Шеваль.* Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета, г.Москва. sheval_e@belozersky.msu.ru.

Одна из основных функция ядерной оболочки состоит в обеспечении селективности импорта белков в ядро. Для направленного переноса белка через ядерную оболочку необходимо наличие в составе белка короткой последовательности – сигнала ядерной локализации (NLS). Для некоторых NLS характерно обогащение положительно заряженными аминокислотами, что делает любой участок белка обогащенный такими аминокислотами потенциальным NLS. В результате, NLS могут быть неотъемлемыми частями некоторых функциональных доменов (интегрированные NLS). Аналогичная ситуация обнаруживается и при анализе сигнальных последовательностей, отвечающих за накопление белков в ядрышке – сигналов ядрышковой локализации (NoLS). Во многих случаях эти сигналы совпадают с NLS, так как для их функционирования также необходимы положительно заряженные аминокислоты. Феномен интегрированности NLS и NoLS позволяет объяснить факты предсказания и экспериментального подтверждения наличия NLS и NoLS в цитоплазматических белках. Однако это ставит вопрос о том, каким образом цитоплазматические белки, содержащие в своем составе интегрированные NLS и NoLS, избегают импорта в ядро и накопления в ядрышке. В докладе обсуждаются выявленные нами NLS и NoLS в составе цитоплазматического белка тропонина I, а также возможные пути их функциональной инактивации.

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ВОЛЬТ-СЕНСОРНЫХ ДОМЕНОВ КАЛИЕВЫХ И НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ: ОТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ЛИГАНДАМИ ДО ТЕРМОДИНАМИКИ ФОЛДИНГА МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ *IN VITRO.*

© *З. О. Шенкарев, А. С. Парамонов, М. Ю. Мышкин, Е. Н. Люкманова, Д. С. Кульбацкий, М. А. Шулепко, Л. Н. Шингарова, А. С. Арсеньев.* Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва
zakhar-shenkarev@yandex.ru.

Потенциалозависимые K^+ и Na^+ каналы (Kv и Nav) играют важную роль в функционировании сердечнососудистой, 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 (Kv) или четырех псевдо-субъединиц в составе слитной полипептидной цепи (Nav), окружающих ионную пору. Каждая из (псевдо-)субъединиц включает в себя потенциалочувствительный (рецепторный) домен (ПЧД, ~150 а.о.),

сформированный четырьмя трансмембранными спиралями (S1-S4), и фрагмент (S5-S6), участвующий в формировании поры. На ПЧД локализованы сайты связывания природных и синтетических соединений, влияющих на потенциалозависимую активацию, например, «вольт-сенсорных» токсинов. ПЧД рассматриваются как перспективные мишени для биомедицинских препаратов, селективно модулирующих работу отдельных каналов.
Модульная организация Kv и Nav каналов позволяет предположить, что в некоторых случаях задачи их изучения могут быть упрощены и сведены к исследованию фрагментов, содержащих изолированные ПЧД. В докладе приводятся результаты структурных исследований ПЧД каналов KvAP, Kv2.1 и Nav1.4 методом ^{1}H,^{13}C,^{15}N-ЯМР спектроскопии. Полученные результаты позволили охарактеризовать пространственную структуру доменов в различных мембраноподобных средах, а также описать характерные модели внутримолекулярной подвижности свойственной этим белкам на двух временных диапазонах (пс-нс и мкс-мс). ЯМР исследования позволили описать молекулярные механизмы взаимодействия мембраноактивных «вольт-сенсорных» токсинов пауков с ПЧД. Изучение термодинамики фолдинга ПЧД-KvAP в средах на основе мицелл детергентов позволило впервые детально охарактеризовать процесс холодовой денатурации для спирального мембранного белка. Ранее «парадоксальный» процесс холодовой денатурации был описан только для глобулярных (водорастворимых) белков.

Работа выполнена при поддержке РНФ (№16-14-10338 исследование ПЧД-Nav1.4) и РФФИ (№ 14-04-01162 исследование термодинамики фолдинга ПЧД-KvAP).

ОКТАЭДРИЧЕСКИЕ КЛАСТЕРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ И ИХ ПЕРСПЕКТИВЫ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ.

© М. А. Шестопалов,[1,2] А. О. Соловьева,[1] А. А. Красильникова,[1] А. А. Иванов,[2] Ю. А. Воротников,[2] Н. А. Воротникова[2].
[1]Научно-исследвательский институт клинической и экспериментальной лимфологии, Новосибирск, [2]Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН
shtopy@niic.nsc.ru

Октаэдрические галогенидные кластерные комплексы молибдена $[\{Mo_6X_8\}X_6]^{2-}$ (X = Cl, Br, I) и халькогенидные комплексы рения $[\{Re_6Q_8\}L_6]$ (Q = S, Se) проявляют долгоживущую люминесценцию в красной области спектра и, как следствие, являются генераторами синглетного кислорода. Это обеспечивает высокую локальную концентрацию тяжелых атомов в кластерном ядре, которая обуславливает хорошую рентгеновскую контрастность комплексов. Немаловажным является тот факт, что такие кластерные комплексы достаточно легко подвергаются химической модификации, что чрезвычайно важно при создании новых кластерных комплексов со специфическими биосовместимыми терминальными лигандами и конъюгатов на их основе.
Таким образом, люминесцирующие и высоко рентгеноконтрастные октаэдрические кластерные комплексы молибдена и рения имеют высокий потенциал для использования, как в фотодинамической терапии, так и в системах биовизуализации.

В настоящей работе был получен широкий спектр различных кластерных комплексов и материалов на их основе, являющихся перспективными агентами как для биологии (клеточный биоимиджинг), так и для медицины (фотодинамическая терапия, рентгеновские контрасты). Так, например, были получены наночастицы диоксида кремния, диаметром 50 нм, допированные кластерными комплексами $(Bu_4N)_2[\{Mo_6I_8\}(NO_3)_6]$. Была успешно продемонстрирована их яркая люминесценция в красной/ближней-ИК областях спектра, а также способность выступать в качестве фотосенсибилизаторов в процессах генерации синглетного кислорода. Были изучены токсические (включая фотоиндуцированную цитотоксичность) показатели таких материалов на перевиваемых клеточных культурах, а также на мышиной модели. Детально изучена их кинетика клеточного накопления и выведения, а также внутриклеточная локализация. Были успешно получены конъюгаты таких наночастиц с моноклональными антителами к Her2/neu и

показана селективность накопления конъюгатов в целевых клетках SKBR-3 с гиперэкспрессией HER2/neu, по сравнению с клетками контрольной группы Hep2.

Также были изучены рентгеноконтрастные свойства кластерных комплексов на модельных цианидных кластерных комплексах, состава $[\{M_6X_8\}(CN)_6]^{n-}$. Было показано, что наилучшими характеристиками обладают комплексы с кластерными ядрами $\{Re_6Te_8\}^{2+}$ и $\{Mo_6I_8\}^{4+}$. Была подробно изучена токсичность цианидных комплексов рения на клеточных культурах и *in vivo*. С целью максимального снижения токсичности и осмолярности кластерных комплексов был синтезирован комплекс с фосфор-содержащим лигандом $(P(C_2H_4COOH)_2(C_2H_4CONH_2))$. Водные растворы такого комплекса обладают низкой токсичностью, высокой скоростью выведения из организма и высокой рентгеновской контрастностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Грант 14-14-00192), а также гранта президента Российской Федерации (МК 4054.2015.3).

УБИКВИТИН-ЛИГАЗА MDM2 КОНТРОЛИРУЕТ РАКОВО-АССОЦИИРОВАННЫЙ МЕТАБОЛИЗМ.

© *О. Ю. Шувалов,[1] Н. И. Марков,[1] А. И. Шакирова,[1] А. В. Петухов,[1] О.А. Фёдорова [1], А.А Дакс, , Е.А Васильева,[1] Н. А. Барлев.[1]*
[1]Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, oleg8988@mail.ru.

Раковые клетки различного генезиса характеризуются специфическими изменениями в метаболизме: усиленным мпортом глюкозы и глутамина, приобретённой способностью к *de novo* синтезу жирных кислот, преимущественным получением энергии за счёт гликолиза, а так же интенсифицированным одноуглеродным метаболизмом. В настоящее время регуляторы и ключевые ферменты раково-ассоциированного метаболизма рассматриваются в качестве перспективных мишеней онкофармакологии.
В рамках данной работы мы использовали протеомный подход для идентификации белков, взаимодействующих с убиквитин-лигазой MDM2. Анализ полученных данных показал, что интерактантами MDM2 являются ключевые ферменты гликолиза, цикла Кребса, окислительного фосфорилирования, фолатного цикла и биосинтеза нуклеотидов, а так же ферменты биосинтеза и деградации жирных кислот. Мы показали физическое взаимодействие MDM2 с рядом ферментов рассматриваемых метаболических путей, а так же их MDM2-зависимое убиквитинилирование. Полученные нами данные свидетельствуют о вовлеченности MDM2 в контроль раково-ассоциированного метаболизма.
Работа поддержана грантами РФФИ 16-34-00869 мол_а и 16-34-60228 мол_а_дк.

АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ MIM, КОРТАКТИН, КОМПЛЕКС ARP2/3 И ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ИОННОГО ТРАНСПОРТА В ЭПИТЕЛИИ СОБИРАТЕЛЬНЫХ ТРУБОЧЕК ПОЧКИ.

© *Л.С.Шуйский,[1,2] Д.В.Илатовская,[2] Ю.А.Негуляев,[1] А.В.Старущенко.[2]* [1]Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, leonid.shuyskiy@gmail.com
[2]Медицинский Колледж штата Висконсин, Милуоки, США.

Эпителиальные натриевые каналы (ENaC), обеспечивающие поддержание водно-солевого гомеостаза в организме, экспрессируются в собирательных трубочках почки. Известно, что разборка F-актина приводит к увеличению вероятности открытого состояния (P_o) ENaC. Ранее нами было показано, что в регуляцию ENaC цитоскелетом вовлечены актин-связывающие белки кортактин и комплекс Arp2/3. Недавно обнаружен адаптерный белок MIM (Missing-In-Metastasis), способный связываться с плазматической мембраной, F-актином и кортактином. Целью данного проекта было определить вовлечение белка MIM в регуляцию ENaC. Работа была проведена на клетках линии CHO, трансфецированных ENaC мыши (mENaC), либо mENaC вместе с белком MIM дикого типа (WT), или его мутантными формами. Согласно данным, полученным методом патч-кламп в отведении от целой клетки, два домена белка MIM – PRD и WH2 вовлечены в отрицательную регуляцию ENaC. Окраска цитоскелета демонстрирует,

что MIM WT индуцирует изменения как подмембранного F-актина, так и мембранных структур. MIM PH, MIM/IMD-L и MIM/IMD-S привели к схожим изменениям, а MIM ΔWH2 и MIM ΔPRD не вызывали подобных изменений, что согласуется с данными экспериментов патч-кламп. Полученные результаты дают основания предполагать участие мультибелкового комплекса, включающего MIM, кортактин и комплекс Arp2/3, в цитоскелет-опосредованной регуляции ENaC. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 13-04-00700.