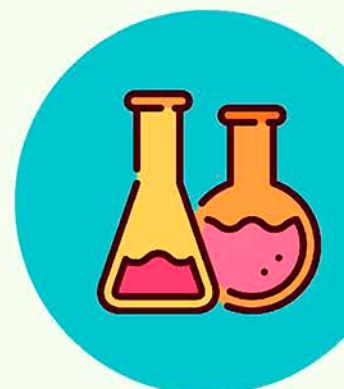
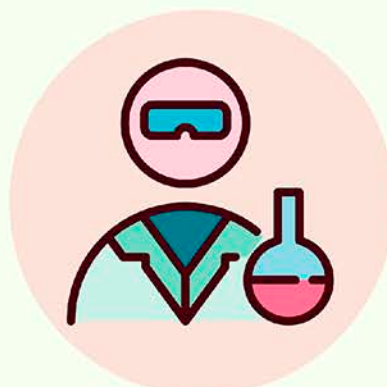


VI МОЛОДЕЖНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

**ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ
ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН**



СБОРНИК ТЕЗИСОВ

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
25-27 АПРЕЛЯ 2018**

Сборник тезисов VI Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. СПб. 2018. – 129 с.

В сборник включены тезисы докладов участников VI конференции для молодых ученых (25–27 апреля 2018, 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, 2018

**ТЕЗИСЫ ПЛЕНАРНЫХ ДОКЛАДОВ НА VI МОЛОДЕЖНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО
МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ
РАН
(Санкт-Петербург, 25–27 апреля 2018 г.)**

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ СТРУКТУР И ПРОЦЕССОВ В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ. © К.А. Лукьянов.^{1,2} ¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, ²Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород.

Зеленый флуоресцентный белок GFP и другие флуоресцентные белки широко используются как генетически кодируемые метки для визуализации структур и процессов в живой клетке. Одним из направлений нашей работы является расширение палитры флуоресцентных белков для многопараметрического мечения – одновременного наблюдения за несколькими структурами и процессами в живой клетке. Для этого создаются новые белки и сенсоры, флуоресцирующие в красной и дальнекрасной областях спектра. Другой возможностью увеличить число независимых каналов детекции является микроскопия времени жизни флуоресценции (Fluorescence Lifetime Imaging, FLIM), которая позволяет разделять флуоресцентные белки одинакового цвета, но с различным временем жизни возбужденного состояния.

Сравнительно новым направлением является использования флуоресцентных белков в качестве оптогенетических молекулярных инструментов для активного влияния на клеточные процессы с помощью света. Так, например, фототоксичные флуоресцентные белки дают возможность создавать строго локализованный окислительный стресс.

Существенной проблемой флуоресцентной микроскопии является фотообесцвечивание меток. Наши работы показали способность флуоресцентных белков к светоиндуцированной передаче электронов, в том числе, в условиях живой клетки. Понимание механизмов этого явления позволило предложить пути резкого увеличения фотостабильности флуоресцентных белков.

Возможным «окончательным» решением проблемы фотостабильности является быстрая замена обесцвеченной молекулы на новую. Мы разработали новый метод мечения белков, основанный специфическом связывании флуорогенного красителя с мутантными вариантами липокалина бактерий. Благодаря обратимому связыванию красителя в белковом кармане, достигается очень высокая фотостабильность сигнала.

Мечение с низкими концентрациями флуорогена позволяет проводить микроскопию сверхвысокого разрешения на основе детекции одиночных молекул.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект №14-25-00129).

РЕГУЛЯТОРНЫЕ БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА ПРИМЕРЕ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА 14-3-3. © Н.Н. Случанко. Группа «белок-белковые взаимодействия», ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва.

Взаимодействия между белками лежат в основе подавляющего большинства жизненно-важных процессов. По некоторым оценкам, человеческий «интерактом» насчитывает 300-650 тыс. белок-белковых взаимодействий (ББВ), которые бывают прочными или временными, гомо- или гетероолигомерными, могут проявляться в норме или патологии. Понимание механизма ББВ и регуляции образования белковых комплексов имеет как фундаментальный, так и прикладной аспект. Как правило, важно понять механизм, последовательность событий при взаимодействии белков, прочность, стехиометрию и пространственную структуру комплексов, что, в свою очередь, открывает возможность для терапевтической модуляции ББВ и коррекции патологических состояний. Интересным примером являются исследования ББВ с участием универсальных адаптерных белков семейства 14-3-3. Общим свойством 14-3-3 является способность взаимодействовать с фосфорилированными формами белков-партнеров, что регулирует процессы апоптоза, клеточного деления, передачи сигнала, работу ионных каналов и т.д. Несмотря на огромное число белков-партнеров 14-3-3 (более 2000), структурной информации об их комплексах очень мало, что замедляет прогресс в понимании многих процессов, регулируемых 14-3-3. Первая структура полноразмерного комплекса 14-3-3 с фосфорилированным белком-партнером (фермент AANAT) была установлена в США в 2001 году. Несмотря на усилия многих лабораторий мира, вторая структура, с малым белком теплового шока HSPB6, была получена нами лишь в 2016 году. Нам удалось не только получить кристаллическую структуру полноразмерного гетеротетрамерного комплекса 14-3-3–HSPB6, но и исследовать механизм их взаимодействия при фосфорилировании HSPB6 и запуске расслабления гладких мышц. Параметры взаимодействия были определены с помощью комбинации методов титрационной калориметрии, флуоресцентной спектроскопии, аналитического ультрацентрифугирования и гель-фильтрации. Решение кристаллической структуры субкомплексов 14-3-3 с фрагментами HSPB6 позволило уточнить информацию о

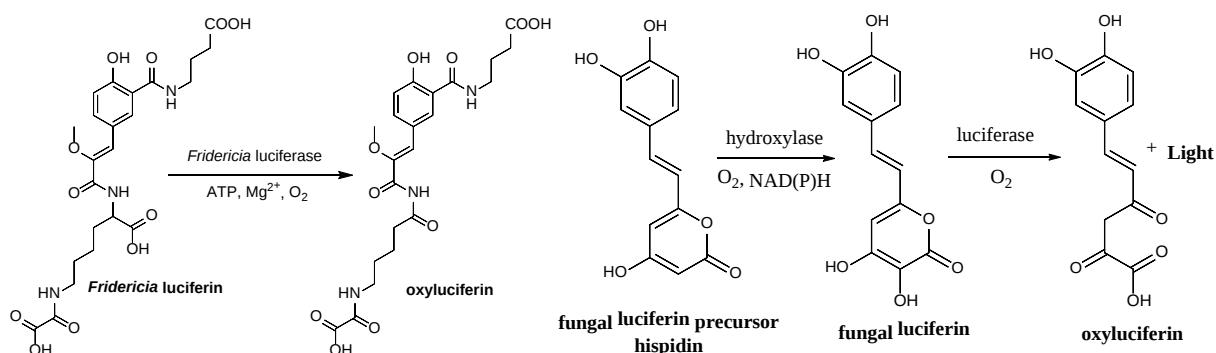
первичном участке связывания, а использование методов ограниченного протеолиза и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS) позволило понять динамику образуемых комплексов и лабильность четвертичной структуры. Помимо фундаментального интереса, полученные данные могут быть использованы при поиске низкомолекулярных модуляторов взаимодействия 14-3-3 и HSPB6.

ХИМИЯ СВЕТА: ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ, ЛЮЦИФЕРИНЫ, ЛЮЦИФЕРАЗЫ. ©

И.В. Ямпольский. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, ivyamp@ibch.ru.

Биолюминесценция – излучение света живыми организмами – широко распространена в природе. По современной оценке, существует около 40 различных химических механизмов «холодного свечения». Излучение кванта света происходит в результате окисления молекулы органического субстрата – люциферина – при катализе ферментом – люциферазой. Среди высших грибов более 100 видов обладают способностью светиться в темноте. За последние годы международной команде исследователей под руководством докладчика удалось расшифровать структуры двух новых люциферинови выяснить механизмы их работы. В 2016 эта же группа установила последовательность и клонировала люциферазу грибов и ферменты биосинтеза люциферина. В докладе будут освещены работы по расшифровке строения люциферин, механизмы излучения света, клонирование биолюминесцентных ферментов и раскрыты перспективы их практического использования.

Работа поддержана грантом РФФ 14-50-00131.



1. Petushkov et al. A novel type of luciferin from Siberian luminous earthworm *Fridericia heliota*: structure elucidation by spectral studies and total synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 5566.

2. Dubinnyi et al. Novel mechanism of bioluminescence: oxidative decarboxylation outside of light-emitting moiety in luciferin from earthworm *Fridericia heliota*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 7065.
3. Purtov et al. The chemical basis of fungal bioluminescence. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 8124.
4. Tsarkova et al. A Tale Of Two Luciferins: Fungal and Earthworm New Bioluminescent Systems. *Acc. Chem. Res.* 2016, 2372.
5. Kaskova et al. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chem. Soc. Rev.* 2016, 6048.
6. Kaskova et al, Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence, *Science Advances*, 2017, e1602847.
7. Kotlobay et al. The enzymatic basis of fungal bioluminescence, 2017, submitted

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ,
ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА VI МОЛОДЕЖНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО
МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ ИНСТИТУТА
ЦИТОЛОГИИ РАН
(Санкт-Петербург, 25–27 апреля 2018 г.)**

АКТИВНОСТЬ ММП И ИЗМЕНЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА КОЛЛАГЕНА I ТИПА ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИОКСИДАНТОВ НА ФИБРОБЛАСТЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА. © А.В. Агафонова, К.М. Кирпичникова, И.А. Гамалей, И.В. Воронкина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *Aleks.cs2009@yandex.ru*.

Состав и структура внеклеточного матрикса, синтезируемого клетками, такими как фибробласты, зависят также от активности матриксных металлопротеиназ (ММП). Ранее было показано, что действие антиоксидантов, в частности N-ацетилцистеина (НАС) не только снижает активности всех ММП, но и влияет на перераспределение коллагена на поверхности фибробластов (Воронкина и др, 2014). В настоящей работе было изучено действие антиоксидантов НАС, альфа-липоевой кислоты (αLA), дигидролипоевой кислоты (DHLA), а также перекиси водорода на синтез коллагена I типа фибробластами кожи человека. Эксперименты проводили на фибробластах дермы человека (4 пассаж) через 7 суток культивирования *in vitro*. Активность ММП изучали с помощью зимографии на желатине и казеине. Количество коллагена определяли в присутствии агента и через 3 суток после его удаления и смены среды. Клетки фиксировали и количество коллагена I типа определяли с помощью окрашивания пикросириусом красным Sirius Red F3B. Количественное определение красителя, связавшегося с коллагеном, проводили на иммунохимическом анализаторе Fluorofot «Charity».

Полученные результаты показали, что исследуемые агенты в разной степени изменяют количество коллагена на поверхности клеток. При этом в присутствии антиоксидантов такие изменения количества коллагена менее выражены, чем через 3 суток после действия агентов. Активность ММП-2, ММП-9 и ММП-1 изменялась при непосредственном действии агентов и значительно усиливалась через 3 суток после смены среды. ММП-1 участвует в деструктуризации фибриллярного коллагена, и изменение ее активности в присутствии агентов может влиять на синтез коллагена фибробластами. Коллаген I типа составляет существенную часть дермы и изменения в синтезе этого белка могут влиять на механическую прочность ткани и ее способность к регенерации.

В настоящий момент не разработаны эффективные методики лечения ряда нейродегенеративных заболеваний таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Куру, болезнь Крейтцфельда — Якоба, Фатальная семейная бессонница и т.д. Их характерной чертой является специфическая агрегация функциональных белков в амилоиды приводящая к деградации нервных клеток. Для описания механизмов амилоидообразования было предложено несколько моделей. При этом, молекулярные пути превращения белков в амилоидную форму остаются неизвестными. Построение и экспериментальная проверка модели образования амилоидов позволит определить факторы запускающие, способствующие или препятствующие развитию указанных заболеваний.

Был написан программный код, позволяющий по экспериментальным данным определять константы ниже представленных моделей, а также сравнивать качество аппроксимации. В ней реализовано три модели агрегации: а) упрощенная модель Маселя, б) обратимое образование зародыша, в) модель, учитывающая инфекционные свойства белка в прионной форме. Первый механизм заключается в следующем: два мономера в нативной форме при встрече образуют прионный устойчивый димер, из которого, за счет встраивания в него других мономеров, вырастает фибрилла. Второй — нативный мономер спонтанно и обратимо становится прионным, к которому присоединяются другие нативные момеры. Третьей — нативный мономер, либо спонтанно и обратимо, либо при взаимодействии с белком уже находящимся в прионной форме сам превращается в прионный. Затем прионные частицы агрегируют в фибриллы.

Обнаружено, что в лабораторных условиях агрегации прионного дрожжевого белка Sup35NMr вероятнее всего реализуется третий способ образования фибрилл. При этом были получены следующие значения констант: $k_i = 10 \pm 1 \text{ (M} \cdot \text{s)}^{-1}$; $k_{pr} = (9 \pm 1) \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$; $k_{up} = (3 \pm 2) \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$; $k_+ = (10 \pm 1) \cdot 10^{-7} \text{ (M} \cdot \text{s)}^{-1}$. Где: k_i — константа «заражения» нативного белка от прионного; k_{pr} — константа превращения нативного белка в прионный; k_{up} — константа превращения прионного белка в нативный; k_+ — константа интеграции мономера в фибриллу.

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ Т-ТУБУЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ КАРДИОМИОЦИТОВ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА СЕРДЦА КРЫС В ОТДАЛЕННОМ ПОСТИНФАРКНОМ ПЕРИОДЕ. © И.С. Андреев ^{1,2}, М.С. Иванова,¹ А.В. Степанов,¹ Г.А. Сакута,¹ Е.В. Байдюк.¹ ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, *andreyev.i.s@gmail.com*.

Процесс сопряжения возбуждения и сокращения является центральным механизмом регуляции работы сердечной мышцы, позволяющим генерировать достаточную силу сокращения и обеспечивать адекватный сердечный выброс в соответствии с потребностями организма. В основе явления сопряжения лежит тесный физический контакт особых инвагинаций сарколеммы – Т-трубочек и терминальных участков саркоплазматического ретикулума на уровне Z-линий во всём объёме клеток миокарда. Поскольку архитектура Т-тубулярной системы играет критическую роль в нормальном функционировании миокарда, всё большее внимание уделяется её исследованию при различных сердечных патологиях, включая инфаркт миокарда. Однако все описания изменений тубулярной системы касаются, как правило, острых периодов поражения миокарда. В данной работе проведен морфометрический анализ системы Т-трубочек кардиомиоцитов левого желудочка сердца крыс через 6 месяцев после экспериментального инфаркта миокарда, вызванного методом перманентного лигирования левой коронарной артерии. Электронно-микроскопическое исследование выявило морфологические изменения Т-тубулярной системы кардиомиоцитов при патологии. Они проявлялись в нарушении их упорядоченной организации, появлении множественных разветвлений и инвагинаций, что в результате приводило к формированию многослойных структур. В некоторых клетках наблюдалось значительное увеличение полости Т-трубочек. В субсарколеммной и околоядерной областях цитоплазмы кардиомиоцитов происходило увеличение их количества. В то же время суммарная длина контактов между Т-трубочками и терминальными участками саркоплазматического ретикулума на единицу площади цитоплазмы кардиомиоцита не изменялась.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ПОСТИНФАРКТНОГО РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ МИОКАРДА. © *Е.В. Байдюк, А.В. Степанов, Д.Е. Бобков, М.С. Иванова, И.С. Андреев, Г.А. Сакута, Б.Н. Кудрявцев.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *katya_bay@mail.ru*.

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности населения во многих странах мира. Благодаря достижениям современной медицины все большее количество людей выживает после острого инфаркта миокарда, однако качество их жизни отличается от нормы: развиваются хроническая сердечная недостаточность, стенокардия и другие заболевания сердечно-сосудистой системы. Таким образом, для поиска новых методов терапевтического воздействия необходимо исследование изменений, происходящих в миокарде в процессе постинфарктного ремоделирования, причем не только в острой стадии заболевания, но и на более поздних сроках. В данной работе с помощью электронно-микроскопического исследования проанализированы ультраструктурные изменения Т-тубулярной системы и митохондриального аппарата кардиомиоцитов крыс через 2 и 26 недель после экспериментального инфаркта миокарда. Для оценки функционального статуса митохондрий кардиомиоцитов клетки выделяли ферментативным методом из левого желудочка сердца контрольных и инфарктных крыс и окрашивали потенциал-зависимым красителем TMRM. Инфаркт миокарда вызывали методом перманентного лигирования левой коронарной артерии. Было получено, что через 6 месяцев после экспериментального инфаркта миокарда происходит значительное увеличение размеров митохондрий, достигающее от 30% до 50% в разных субпопуляциях митохондрий. Максимальные изменения были обнаружены в субсарколеммной популяции митохондрий. При этом происходили значительные изменения упаковки крист митохондрий, наблюдался переход от пластинчатой формы к ячеистой. Измерение интегральной интенсивности флуоресценции окрашенных TMRM митохондрий показало, что в кардиомиоцитах крыс, перенесших инфаркт миокарда, она на 39 % ниже, чем в контроле. Среднее значение интенсивности флуоресценции в пересчете на единицу площади клетки было ниже контрольного на 24 %.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИНГИБИРОВАНИЯ АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА, БЫКА И КРЫСЫ ИБУПРОФЕНОМ И ВАРФАРИНОМ ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ. © *А.А. Баталова,¹ Д.А. Белинская,¹ Н.В. Гончаров.^{1,2}* ¹Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, Санкт-Петербург, ²Институт гигиены,

Известно, что, помимо транспортной функции, альбумин обладает эстеразной активностью, в том числе по отношению к фосфорорганическим соединениям (ФОС). Показано, что сайт Садлоу-1 альбумина отвечает за истинно эстеразную активность (связывание субстрата с ферментом с последующим распадом комплекса на фермент и продукт), а сайт Садлоу-2 – за псевдоэстеразную (необратимое связывание субстрата с ферментом). В биохимических и токсикологических экспериментах, направленных на изучение эстеразной активности альбумина, применяются специфические ингибиторы сайтов Садлоу-1 и 2: варфарин и ибупрофен соответственно. Для биохимических экспериментов используется преимущественно бычий альбумин, токсикологические тестирования проводятся на грызунах. Влияние межвидовых различий на эффективность взаимодействия варфарина и ибупрофена с альбумином до конца не изучено. В данной работе впервые методами молекулярного моделирования была рассчитана эффективность взаимодействия варфарина с сайтом Садлоу-1 и ибупрофена с сайтом Садлоу-2 альбумина человека (ЧСА), быка (БСА) и крысы (КСА). Методом теоретического конформационного анализа с помощью программных пакетов HyperChem и Marvin Suite были построены трехмерные модели и рассчитаны структурные и физико-химические характеристики молекул ибупрофена и варфарина. Геометрические и энергетические характеристики связывания лигандов в сайтах Садлоу-1 и Садлоу-2 были определены методом молекулярного докинга с помощью программы AutoDock. Расчет значений константы диссоциации кислоты pK_a ибупрофена и варфарина выявил, что оба эти лиганда при физиологических значениях pH депротонированы. Согласно данным молекулярного докинга, варфарин связывается с сайтом Садлоу-1 ЧСА и КСА с одинаковой эффективностью, соотношение вкладов ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий в эффективность ингибирования одинаково для обоих ферментов. По отношению к сайту Садлоу-1 БСА варфарин обладает лучшим сродством, чем в случае ЧСА и КСА, положение молекулы варфарина внутри сайта также иное для БСА. Основной вклад в эту разницу вносят ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Возможно, такие различия связаны с асимметрией аминокислот сайта: в молекуле ЧСА и КСА в 199 позиции находится лизин и в 222 позиции аргинин, в БСА – наоборот. Ибупрофен взаимодействует с сайтом Садлоу-2 ЧСА и КСА с одинаковой эффективностью. Ибупрофен показал меньшее сродство к сайту Садлоу-2 БСА по сравнению с ЧСА и КСА, причем за счет и электростатических, и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Разная

эффективность ибупрофена и разная роль отдельных взаимодействий может быть связана с заменой аминокислоты в позиции 449 (аланин в ЧСА, треонин в БСА, валин в КСА). Полученный результат свидетельствует о том, что функциональные характеристики сывороточного альбумина человека и крысы отличаются между собой в меньшей степени по сравнению с функциональными характеристиками бычьего альбумина. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-015-00304.

ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИ(Ц)-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ДЛЯ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК. © Е.И. Бахмет,¹ И.Б. Назаров,¹ Н.Е. Воробьева,² Т.О. Артамонова,³ М.А. Ходорковский,³ А.Н. Томилин¹ ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ² Институт Биологии Гена РАН, Москва, ³ Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург, *e.bakhmet@incras.ru*.

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) отличаются своей способностью к самообновлению и к дифференцировке во все типы соматических клеток. В последнее десятилетие ПСК разделяют на ранние (наивные) и поздние (праймированные) в зависимости от их присутствия на разных стадиях эмбриогенеза, условий культивирования и т.д. Oct4 является ключевым транскрипционным фактором ПСК. Его ген *Pou5f1* подвержен тонкой регуляции через промотор, проксимальный энхансер (ПЭ), активный в праймированных ПСК и дистальный энхансер (ДЭ), активный в наивных ПСК. Эти участки являются мишенями для метилирования и связывания с регуляторными белками. Дистальный энхансер, в свою очередь имеет две ключевые последовательности – сайт 2А, и сайт 2Б. В то время, как с сайтом 2Б связывается гетеродимер Oct4-Sox2, было показано, что белки, связывающиеся с сайтом 2А (ССССТССССС), присутствуют как в ПСК, так и в дифференцированных клетках. С помощью методов аффинной хроматографии и масс-спектрометрии нами было показано, что *in vitro* такими белками являются два представителя поли(Ц)-связывающих белков – hnRNPК и Pcbp1. Методом хроматин-иммуннопреципитации было подтверждено присутствие hnRNPК на дистальном энхансере *Pou5f1* в наивных ПСК, в то время как в праймированных клетках, оба белка присутствуют как на дистальном, так и на проксимальном энхансерах. Кроме того, с помощью генного нокаута на основе системы CRISPR-Cas9, нами было показано, что ПСК, нокаутные по hnRNPК нежизнеспособны, как и дифференцированные клетки. При этом, отсутствие Pcbp1 не сказалось на жизнеспособности наивных ПСК, а уровень Oct4 оставался неизменным, но при попытке *in vitro* дифференцировки этих клеток в

праймированное состояние, большинство клеток погибло. Наши данные указывают на большое значение hnRNPK и Rcbp1 для наивной и праймированной плюрипотентности.

ТИЕНОПИРИМИДИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ СПЕЦИФИЧНО АКТИВИРУЮТ СТЕРОИДОГЕНЕЗ В СЕМЕННИКАХ, НО НЕ ВЛИЯЮТ НА ФУНКЦИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. © А.А. Бахтюков, К.В. Деркач, Т.С. Шарова, А.О. Шпаков. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, bahtyukov@gmail.com.

Важнейшими регуляторами мужской репродуктивной системы являются лютеинизирующий гормон (ЛГ) и его гомолог хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), которые в семенниках специфично связываются с рецепторами ЛГ/ХГЧ и стимулируют синтез ими тестостерона (Т). Поскольку применение гонадотропинов сопряжено с побочными эффектами, то разрабатываются низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ/ХГЧ, которые взаимодействуют с аллостерическим сайтом, расположенным в трансмембранном канале рецептора, в то время как эктодомен, с которым связываются гонадотропины, остается в этом случае свободным. Как нами, так и другими авторами ранее были синтезированы тиенопиримидиновые производные (ТП), которые активируют рецептор ЛГ/ХГЧ и повышают продукцию Т в условиях *in vitro* и *in vivo*. Однако аллостерический сайт рецептора ЛГ/ХГЧ близок по структуре таковому рецептору тиреотропного гормона (ТТГ), вследствие чего не исключена возможность взаимодействия ТП с рецептором ТТГ. Цель работы состояла в изучении влияния синтезированных нами соединений – ТП01, ТП02, ТП03, ТП04, ТП21, ТП22 и ТП23 на базальную и стимулированную гонадотропинами (ХГЧ, ТТГ) активность аденилатциклазы (АЦ) в плазматических мембранах, выделенных из семенников и щитовидной железы (ЩЖ) крыс, а также на базальные и стимулированные люлиберином и тиролиберином уровни Т и тиреоидных гормонов при введении ТП самцам крыс. Все ТП (10^{-4} М) повышали базальную активность АЦ в тестикулярных мембранах. Стимулирующие эффекты ТП03 и ТП23 составили 46 и 39% и были сопоставимы с таковым ХГЧ (10^{-9} М). В мембранах, выделенных из ЩЖ, где рецепторы ЛГ/ХГЧ отсутствуют, только ТП21 влиял на активность АЦ, но его эффект составил лишь 6% от такового ТТГ (10^{-9} М). Таким образом, ТП в концентрации, в которой достигается их максимальный эффект на АЦ в тестикулярных мембранах, практически не влияли на аденилатциклазную систему в тироидальных мембранах. Введение ТП самцам крыс (в/б,

25 мг/кг) через 1 ч приводило к повышению уровня Т, причем этот эффект усиливался через 3 ч. У крыс, которых сначала обрабатывали ТП03, а через 30 мин люлиберин (интраназально, 10 пг/крысу), отмечали аддитивность эффектов ТП и ЛГ, секретируемого гонадотрофами в ответ на обработку люлиберин. Стимулирующее влияние ТП на уровни тиреоидных гормонов, хотя и слабо выраженное, было показано только для ТП21. Стимулирующий эффект интраназально вводимого тиролиберина на уровни тиреоидных гормонов (tT4, tT3) у крыс, обработанных ТП03, не менялся, что исключает возможность ингибирующего влияния ТП на рецептор ТТГ в ЩЖ. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что, за исключением ТП21, все изученные ТП с активностью агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ не взаимодействуют с рецептором ТТГ и не влияют на продукцию тиреоидных гормонов, являясь специфичными регуляторами репродуктивной системы.

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 16-04-00126).

ДИНАМИКА УРОВНЯ мРНК ИЗОФОРМ ТРАНСКРИПТОВ II ЭКЗОНА ГЕНА *HTR2A* ПРИ АНТИПСИХОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ. ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ RS6311. © М.А. Белинская,¹ А.М. Заботина,^{1,2} М.Н. Грунина,¹ А.С. Журавлев,¹ Р.Ф. Насырова,³ Е.М. Крупицкий,³ А.Е. Тараскина.^{1,2,3} ¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Ленинградская область; ²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург; ³Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии имени В.М. Бехтерева, Санкт-Петербург. *belinskaya88@gmail.com*.

Альтернативный сплайсинг относится к механизмам посттранскрипционных модификаций мРНК, обеспечивающих функциональное разнообразие белков, транслируемых с одного гена. Серотониновый рецептор 2A (5-HTR2A) – является ключевой мишенью действия атипичных антипсихотических препаратов, применяющихся при терапии психических расстройств. Однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) rs6311 *HTR2A* расположен в промоторной области гена и ассоциирован с нарушением эффективности посттранскрипционных процессов. Цель нашего исследования – оценка уровня мРНК изоформ транскриптов II экзона *HTR2A* в ходе терапии антипсихотиками

психически больных в зависимости от аллельных вариантов rs6311 и эффективности проводимой терапии.

В исследование включено 60 пациентов мужского пола (от 18 до 55 лет) с первым психотическим эпизодом расстройств шизофренического спектра, случайно разделенные на две группы фармакотерапии (галоперидол/оланзапин). Материалом исследования служили мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК). Количественный анализ транскриптов II экзона *HTR2A* (E2+, Etr и E2-) проводили методом ПЦР в реальном времени в присутствии EVA GREEN. Идентификация ОНП rs6311 - методом анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов.

В ходе работы мы установили достоверное снижение экспрессии мРНК усеченного второго экзона E2- ($p=0,025$) у носителей генотипа AA ОНП rs6311 при терапии оланзапином. Влияние на эффективность антипсихотической терапии экспрессия альтернативных изоформ транскриптов II экзона гена *HTR2A* не оказывала. Работа поддержана грантом РФФИ 18-315-00321

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА *АМОЕБА* *PROTEUS*: ЭКСТРУЗИЯ ХРОМАТИНА. © М.А. Бердиева,¹ С.Ю. Демин,¹ В.А. Васильева,² Ю.И. Подлипная,¹ А.В. Гудков.¹ ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, maria.berd4@yandex.ru.

Представители рода *Amoeba* – свободноживущие голые лобозные амёбы (*Amoebozoa*, *Tubulinea*, *Euamoebida*), – всемирно распространенные, облигатно агамные организмы. Несмотря на длительную историю изучения, эти одноклеточные эукариоты до сих пор привлекают внимание исследователей, в частности, в вопросах, касающихся видообразования, происхождения и эволюции полового процесса. Недавно в клеточном цикле представителей рода *Amoeba* было описано явление синтеза «избыточной» ДНК (гиперрепликации), приводящее к более чем трехкратному увеличению количества ДНК в ядре в ходе интерфазы; «излишняя» ДНК, как предполагалось, затем элиминируется (Kalinina et al., 1986; Махлин, 1993). Подобные флуктуации содержания ДНК в ядре в клеточном цикле представляют собой один из вариантов проявления динамичности эукариотного генома – циклическую полиплоидию (Parfrey et al., 2008; Lahr et al., 2011). Недавно нами было обнаружено явление экстрезии – элиминации хроматина путем механического выброса из ядра. Мы предполагаем, что это один из процессов, обеспечивающих регуляцию количества ДНК в ядре амёб. В настоящей работе изучен

процесс экстррузии в клеточном цикле у *Amoeba proteus*, штамм В, *Amoeba* sp., штамм CONT и *Amoeba borokensis*. Структурно-пространственная организация хромосомного аппарата клеток в частично синхронизированной культуре исследована с использованием методов флуоресцентного мечения ДНК и получения трехмерных реконструкций. Для всех изученных штаммов показано наличие выбросов хроматина из ядер в ходе жизненного цикла; проанализированы объем, линейные параметры и количество сайтов экстррузии, приуроченность к стадиям клеточного цикла. Ультраструктура ядер амёб в момент экстррузии изучена с использованием методов электронной микроскопии. Кроме того, проанализированы особенности организации актинового цитоскелета амёб в момент выброса хроматина и его предположительная роль в обеспечении данного процесса.

ПОЛЯРИЗАЦИЯ МАКРОФАГОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИЧЕСКОГО СТРЕССА. © П.И. Бобылёва, О.Ю. Алексеева, О.В. Жидкова, Е.Р. Андреева. ГНЦ РФ - Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, blastoblast@gmail.com.

Свойства макрофагов (МФ) как участников ремоделирования тканей при повреждении существенно зависят от условий локального микроокружения. Модуляция функциональной активности МФ приводит к провоспалительной (M1) либо противовоспалительной (M2) поляризации фенотипа. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК), структурный и регуляторный элемент ниши МФ, способствуют формированию фенотипа МФ, сходного с M2. При остром гипоксическом стрессе в повреждённой ткани значительно изменяется функциональная активность МСК, что может отразиться на взаимодействии с МФ.

Оценку изменения фенотипа моноцитов/макрофагов (МН/МФ) в присутствии МСК при остром гипоксическом стрессе проводили с использованием системы *in vitro*. Монокультуру МН и сокультуру с МСК культивировали в течение недели – времени, необходимого для созревания МН/МФ в монокультуре. Полученные МН/МФ подвергали короткому (24 ч) и длительному (72 ч) гипоксическому воздействию (1% O₂). Влияние гипоксии на профиль экспрессии поверхностных антигенов МН/МФ оценивали цитофлуориметрически, определяя уровень CD163, CD206 - M2 фенотип МФ, CD11b, CD68 - созревание МФ, HLA-DR, CD80, CD86 – активация МФ.

В присутствии МСК созревание МН/МФ не отменялось (экспрессия CD11b, CD68), при этом клетки проявляли признаки М2 поляризации (CD206). В результате как контактного, так и паракринного взаимодействия с МСК снижалась экспрессия антигенов, связанных с провоспалительной активацией. Помимо иммунорегуляторного действия МСК осуществляли также стромальную функцию, реализация которой проявлялась в поддержании высокой жизнеспособности МН/МФ.

Короткий гипоксический стресс (24 часа, 1% O₂) потенцировал эффекты МСК при прямом контакте с МН/МФ, что приводило к снижению экспрессии молекул, опосредующих провоспалительную активацию (HLA-DR), и к повышению уровня молекул, характерных для М2 фенотипа (CD206). МСК эффективно поддерживали жизнеспособность МН/МФ в условиях короткого гипоксического стресса. При длительной гипоксической экспозиции (72 ч) было менее выражено проявление признаков М2 поляризации МН/МФ (CD206, CD163) и более значимо снижалась экспрессия молекул, участвующих в провоспалительной активации (HLA-DR). Непосредственный контакт с МСК нивелировал цитотоксический эффект длительного гипоксического воздействия на МН/МФ, выявленный в монокультуре.

Таким образом, при взаимодействии с МСК в условиях гипоксического стресса МН/МФ характеризовались промежуточным фенотипом и экспрессировали антигены, характерные для М2-МФ. В зависимости от длительности гипоксического воздействия изменялось соотношение про/антивоспалительных молекул в профиле экспрессии МН/МФ, что может определять характер их участия в развитии воспалительной реакции.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-04-00942

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МСК ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ ИММУНОМОДУЛЯТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА. © П.И. Бобылёва, А.Н. Горностаева, М.И. Ездакова. ГНЦ РФ - Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, blastoblast@gmail.com.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) обладают рядом свойств, ценных с точки зрения регенеративной медицины. Одной из них является возможность их аллогенного использования, которая обусловлена «иммуноуклончивостью» МСК. Однако при определённых условиях они всё же могут стать мишенью для иммунных клеток при аллогенном контакте, поэтому важно понимать возможное влияние иммунных клеток реципиента на введённые МСК. В данной работе

для оценки возможных эффектов контактного и паракринного взаимодействия использовали систему *in vitro*: МСК в течение 72 ч сокультивировали с ФГА-активированными аллогенными мононуклеарами периферической крови (МНК) при непосредственном контакте или при разделении полупроницаемой мембраной трансвелл.

Несмотря на повышение экспрессии HLA-ABC на МСК при взаимодействии с МНК, цитотоксического эффекта не наблюдалось, и МСК сохраняли высокую жизнеспособность. Цитофлуориметрический анализ состояния клеточных органелл с использованием соответствующих флуоресцентных зондов показал небольшое увеличение трансмембранного потенциала митохондрий МСК, лизосомальной активности и повышение уровня внутриклеточных АФК, которое было особенно выражено при непосредственном контакте с МНК.

МСК проявляли иммуномодуляторную активность при контактном и паракринном взаимодействии с МНК: снижалась пролиферация и экспрессия маркёров активации (HLA-DR) МНК. Экспрессия HLA-DR на МСК практически не наблюдалась, что может говорить об отсутствии дополнительной стимуляции иммунных клеток. Анализ прироста выявил замедление пролиферации МСК при контактном взаимодействии с МНК. В модели «раны» было обнаружено, что контактное и паракринное взаимодействие с активированными МНК способствовало снижению подвижности МСК. Непосредственный контакт с МНК приводил к уменьшению интенсивности накопления минерализованного матрикса МСК при культивировании в остеоиндуцирующей среде, что свидетельствовало о снижении активности остеодифференцировки. При анализе паракринного профиля сокультуры МСК и МНК было отмечено существенное снижение концентрации провоспалительных цитокинов TNF α , TNF β , IL-6. В МСК повышалась продукция LIF и VEGF, более выраженно при непосредственном контакте. Таким образом, при взаимодействии с иммунными клетками происходит модуляция метаболизма внутриклеточных органелл, что в конечном итоге приводит к изменению функциональной активности МСК. Причём это связано не только с активацией иммуномодуляторных свойств МСК, но и с изменением функций, обеспечивающих участие МСК в репаративном remodelировании. Так, происходили снижение пролиферативной активности, подвижности, дифференцировочной активности и сдвиг паракринного профиля в сторону противовоспалительного и проангиогенного, что представляет интерес в связи с возможным использованием аллогенных МСК в клеточной терапии.

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента МК-2976.2018.4, гранта РФФИ 18-015-00461 А

ВЛИЯНИЕ БЕЛКА HAP1A НА ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ БОЛЕЗНЬ ХАНТИНГТОНА. © В.А. Боева, В.А. Вигонт, А.Ю. Скопин, Е.В. Казначеева. Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, vs99516@gmail.com.

Болезнь Хантингтона (БХ) – аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, связанное с мутацией в гене, кодирующем белок хантингтин, и вызванное увеличением количества глутамин-кодирующих повторов. Хантингтин выполняет адаптерные функции, определяет колокализацию взаимодействующих с ним белков. Наиболее сильно подвержены дегенерации нейроны стриатума, функцией которого является, в частности, регуляция мышечного тонуса. Следствием этого является развитие дрожательного паралича конечностей, что дало данной патологии второе название хорей Хантингтона. Одним из токсических эффектов мутантного хантингтина (mHtt) является нарушение кальциевой сигнализации в клетке, в частности образование белкового комплекса mHtt и IP₃R1 (рецептора инозитол-1,4,5-трифосфата 1), что, как было показано ранее, приводит к увеличению аффинности рецептора к своему лиганду и увеличению депо-управляемого входа кальция. Для белка HAP1 (Huntingtin-associated protein 1) было показано, что он связывается с хантингтином, и IP₃R1-HAP1A-mHtt образуют троичный белковый комплекс, который еще больше увеличивает аффинность рецептора к инозитол-1,4,5-трифосфату. В данной работе мы, используя метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации whole-cell, показали, что экспрессия белка HAP1A в клетках человеческой нейробластомы SK-N-SH, моделирующих БХ, приводит к появлению пула конститутивно-активных депо-управляемых кальциевых каналов. Далее, используя метод регистрации внутриклеточной концентрации кальция с помощью флуоресцентного зонда Fura-2AM, мы показали увеличение базального уровня концентрации кальция в клетках. Также было показано, что экспрессия белка HAP1A в клетках SK-N-SH, моделирующих БХ, не влияет на экспрессию белков Orail, STIM1, TRPC1, поддерживающих депо-управляемый вход кальция в данных клетках. Работа поддержана Грантом РФ №17-74-20068, Стипендией Президента РФ, Грантом РФФИ № 17-54-80006 БРИКС-а.

ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА НА 3-ФОСФОИНОЗИТИДНЫЕ ПУТИ В ПЕЧЕНИ И ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС С ОЖИРЕНИЕМ, ВЫЗВАННЫМ ВЫСОКОУГЛЕВОДНОЙ И ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТОЙ. © Д.М. Бузанаков, А.А. Перминова, К.В. Деркач, А.О. Шпаков. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, *kulikova9404@gmail.com*.

Метформин (МФ) является препаратом первой линии выбора при лечении сахарного диабета 2-го типа. В основе его терапевтического эффекта лежит способность повышать чувствительность тканей к инсулину и снижать продукцию глюкозы гепатоцитами, что улучшает гликемический контроль и восстанавливает энергетический обмен, нарушенные при диабете. В последние годы появились клинические данные, демонстрирующие, что МФ может улучшать энергетический гомеостаз при ожирении, в том числе вызванном несбалансированной диетой. Однако механизмы этого до конца не выяснены. Предполагается, что основными мишенями МФ являются инсулиновая и лептиновая сигнальные системы как на периферии, так и в ЦНС. Основным внутриклеточным каскадом, который регулируется инсулином и лептином, является 3-фосфоинозитидный каскад, включающий инсулиновый или лептиновый рецептор, инсулин-рецепторные субстраты IRS1 и IRS2, фосфатидилинозитол-3-киназу и Akt-киназу. Цель работы состояла в изучении влияния обработки МФ (200 мг/кг/сут, 8 недель) крыс с ожирением, вызванным комбинированной высокожировой и высокоуглеводной диетой, на активность 3-фосфоинозитидного каскада в гипоталамусе и печени, важнейших мишенях инсулина и лептина. Для этого с помощью вестерн-блоттинга оценивали фосфорилирование Akt-киназ по остатку Ser⁴⁷³ в печени и гипоталамусе, а также фосфорилирование IRS1 по Ser³⁰⁷ в печени и IRS2 по Ser⁷³¹ в гипоталамусе у крыс с ожирением без лечения (ОЖ) и с лечением МФ (ОЖМ). Обработка крыс с ожирением с помощью МФ снижала массу тела и жировой ткани, нормализовала уровни глюкозы, инсулина и лептина, повышенные при ожирении, восстанавливала чувствительность к инсулину. Показано, что в печени крыс группы ОЖ Ser⁴⁷³-фосфорилирование Akt-киназ было снижено, в то время как Ser³⁰⁷-фосфорилирование IRS1, напротив, повышалось, что является характерным признаком развития инсулиновой резистентности. Обработка МФ полностью восстанавливала фосфорилирование белков, что свидетельствует о нормализации чувствительности гепатоцитов к инсулину и хорошо согласуется с улучшением метаболических показателей. В гипоталамусе крыс группы ОЖ Ser⁴⁷³-фосфорилирование Akt-киназ менялось слабо, в то время как Ser⁷³¹-фосфорилирование

IRS2 существенно повышалось. Лечение МФ снижало его до контрольного уровня, что указывает на восстановление чувствительности гипоталамических нейронов к инсулину и лептину. Восстановление 3-фосфоинозитидного сигналинга в гипоталамусе может вносить вклад в нормализацию пищевого поведения и энергетического гомеостаза. Таким образом, лечение МФ крыс с ожирением, вызванным высокожировой и высокоуглеводной диетой, приводит к восстановлению сигнальных механизмов действия инсулина и лептина на периферии и в ЦНС, что является одним из механизмов действия этого препарата.

Работа поддержана грантом РНФ (№ 16-15-10388).

СЕКРЕТИРУЕМЫЙ БЕЛОК ЧЕЛОВЕКА SLURP-1 КОНТРОЛИРУЕТ РОСТ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ РАКОВЫХ КЛЕТОК, ВЗАИМОДЕЙСТВУЯ С НИКОТИНОВЫМИ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ $\alpha 7$ ТИПА. © М.Л. Бычков, О.В. Шлепова, М.А. Шуленко, Е.Н. Люкманова. Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, ekaterina-lyukmanova@yandex.ru.

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) являются лигандозависимыми ионными каналами, экспрессирующимися во многих тканях организма и участвующими в регуляции ключевых клеточных процессов. В опухолевых клетках nAChR вовлечены в процессы пролиферации, миграции, инвазии, ангиогенеза и апоптоза. Поэтому nAChR представляют собой перспективные мишени для терапии онкологических заболеваний, а антагонисты nAChR могут стать новыми эффективными противоопухолевыми препаратами. Ранее нами была разработана система бактериальной продукции рекомбинантного аналога белка человека SLURP-1, ауто/паракринного регулятора гомеостаза эпителия, и показано, что SLURP-1 является антагонистом nAChR.

В представленной работе мы показали, что клетки меланомы A431, карциномы легкого A549 и карциномы груди SKBR3 экспрессируют nAChR $\alpha 7$ типа ($\alpha 7$ -nAChR), и рекомбинантный SLURP-1 ингибирует рост раковых клеток с полуэффективными концентрациями в наномолярном диапазоне, при этом, не проявляя цитотоксичности по отношению к нормальным клеткам кожи (кератиноциты Het-1A и HaCaT) в этом диапазоне концентраций. Показано, что рекомбинантный препарат SLURP-1 солокализуется с $\alpha 7$ -nAChR в раковых клетках, и ингибирование роста изучаемых клеток происходит в результате взаимодействия SLURP-1 именно с nAChR. Обработка раковых клеток препаратом SLURP-1 приводит к падению экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в этих клетках и

вызывает секрецию эндогенного *SLURP-I* из внутриклеточных депо, стимулируя, таким образом, соседние клетки.

Работа выполнена при поддержке РНФ (№17-74-20161).

ИСТОРИЯ ОДНОГО ПАУЧЬЕГО ТОКСИНА. © А.А. Василевский. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, avas@ibch.ru.

Яд пауков служит, пожалуй, наиболее богатым источником нейроактивных белков и пептидов. К числу наиболее известных токсинов, используемых в нейробиологии, относятся ω -агатоксин-IV, селективный блокатор кальциевых каналов Р-типа, и α -латротоксин, мощный стимулятор нейроэкзоцитоза. В 2008 году мы описали несколько токсинов из яда крошечного паука-бокохода *Heriades melloteei*. В то время это было своего рода техническим достижением, поскольку из природного источника можно было получить лишь мельчайшие количества яда. Затем было показано, что один из токсинов, названный Nm-3, ингибирует активацию нескольких изоформ натриевых каналов млекопитающих и насекомых. В дальнейшей работе выяснилось, что Nm-3 является первым специфичным лигандом потенциал-чувствительного домена I натриевых каналов. Однако наиболее любопытным наблюдением служит то, что Nm-3 избирательно блокирует так называемые « ω -токи» в мутантных каналах Nav1.4, характерных для скелетных мышц пациентов с гипокалиемическим периодическим параличом. Мы полагаем, что Nm-3 и подобные ему токсины могут представлять собой хорошую основу для разработки блокаторов ω -токов и терапии врожденных параличей.

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ КАТИОННЫХ КАНАЛОВ PIEZO1 И ENAC В КЛЕТКАХ ЛЕЙКЕМИИ ЧЕЛОВЕКА. © В.Ю. Васильева, А.В. Сударикова, И.О. Васильева, Е.А. Морачевская, Ю.А. Негуляев, В.И. Чубинский-Надеждин. Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, vasileva.valeriia@gmail.com.

В предшествующих работах нами исследованы ионные каналы, обеспечивающие вход катионов в клетках миелоидной лейкемии человека K562. С помощью метода патч-кламп при отведении от участка клеточной мембраны (cell-attached) или от мембранного

фрагмента (inside-out) обнаружено два типа каналов, отличающихся проводящими свойствами и механизмами активации. Так, в ответ на растяжение мембраны (стретч-активация) была зарегистрирована активность механочувствительных каналов (МЧК) с проводимостью около 18 пСм, показана их проницаемость для Ca^{2+} . Также в клетках K562 были обнаружены натрий-селективные каналы с проводимостью 12-14 пСм, непроницаемые для кальция, близкие по своим характеристикам к каналам ENaC, но не обладающие чувствительностью к амилориду и его производным. Как показано ранее, характерной особенностью натриевых каналов в клетках лейкемии человека является связь активации и инактивации каналов с динамикой примембранного актина. Целью настоящей работы было исследование действия потенциальных внеклеточных активаторов и блокаторов механочувствительных и натриевых каналов для проверки гипотез об их молекулярной природе, с учетом данных ОТ-ПЦР анализа. Основное ограничение конфигураций cell-attached и inside-out – невозможность варьировать состав раствора, имитирующего внеклеточный, в ходе эксперимента. В данной работе мы использовали уникальные возможности регистрации активности одиночных каналов в мембране клеток K562 при отведении whole-cell, что позволяло осуществлять смену внеклеточного раствора. В первой серии опытов проверена гипотеза о принадлежности МЧК в клетках K562 к семейству Piezo. Добавление в наружный раствор активатора Piezo1 –низкомолекулярного гетероциклического соединения Yoda1(5 мкМ)-индуцировало активность каналов с проводимостью около 18-20 пСм, что близко к значениям, полученным в опытах с растяжением клеточной мембраны. Yoda1-индуцированные токи ингибировались блокатором МЧК гадолинием (Gd^{3+} , 10 мкМ). Эти данные могут служить аргументом в пользу предположения о том, что трансмембранные белки Piezo1 являются молекулярными коррелятами МЧК в клетках K562. В следующих сериях whole-cell экспериментов показана стимуляция активности ENaC-подобных каналов в ответ на добавление во внеклеточный раствор деструктора F-актина цитохалазина Д или протеазы трипсина, который считается одним из уникальных активаторов “классических” каналов ENaC. Цитохалазин- или трипсин-индуцированные каналы не блокировались амилоридом и имели характеристики, близкие к полученным ранее. Таким образом, электрофизиологические данные подтверждают гипотезу о функциональной экспрессии амилорид-нечувствительных каналов ENaC в клетках K562. Результаты демонстрируют преимущества используемой экспериментальной модели для регистрации ионных токов и исследования одиночных каналов при отведении от плазматической мембраны всей клетки. Работа поддержана грантом РНФ 17-74-10123.

ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНАЯ НЕЙРОНАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА.

© В.А. Вигонт, А.Ю. Скопин, Е.В. Казначеева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vvigand@gmail.com.

Наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями нейродегенеративные патологии являются одной из наиболее серьезных и социально-значимых проблем современной медицины. Для изучения молекулярных механизмов нейродегенерации, равно как и для проведения исследований, связанных с поиском новых лекарств, исключительно важным является создание адекватных моделей заболевания. Особый интерес представляют модели наследственных нейродегенеративных патологий, основанные на эндогенной экспрессии мутантных форм белков в нейронах, дифференцированных из пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs). Подобные модели наиболее точно воспроизводят нарушение молекулярных механизмов исследуемых заболеваний и, кроме того, позволяют изучать именно тот тип клеток, который подвержен селективной гибели при той или иной конкретной патологии. Анализ литературных данных позволяет предположить, что нарушения кальциевой сигнализации могут являться одним из центральных механизмов, лежащих в основе гибели нейронов при развитии нейродегенеративных заболеваний человека. Ранее нами было показано патологическое увеличение депо-управляемого входа кальция в пациент-специфичной модели болезни Хантингтона. Анализ полученных электрофизиологических данных позволяет заключить, что в результате опустошения внутриклеточных кальциевых депо в нейронах человека, полученных из пациент-специфичных iPSCs могут активироваться, по меньшей мере, два различных типа каналов со сходными амплитудами токов при отрицательных потенциалах, но со значительно различающимися Вольт-Амперными характеристиками в области положительных потенциалов. Далее мы показали, что потенциальное терапевтическое соединение EVP4593 способно снижать вход кальция через любой из этих каналов приблизительно на 70%. Работа поддержана Грантом РФ № 17-74-20068, стипендией Президента РФ, Грантом РФФИ № 17-54-80006 БРИКС-а.

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА НА СТРУКТУРНЫЕ СВОЙСТВА ПРОТИМОЗИНА АЛЬФА. © Ю.А. Гагарская,¹ О.И. Поварова,¹ Н.П. Родина,^{1,2}

А.И. Сулацкая,¹ М.И. Сулацкий,¹ М.М. Карасёв,³ И.М. Кузнецова,¹ К.К. Туроверов.^{1,2}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, ³University of Helsinki, Finland, *julgag@yandex.ru*

В цитоплазме и нуклеоплазме клетки наряду с компартментами, ограниченными липидными мембранами, существует множество высокофункциональных и динамичных немембранных органелл. Оказалось, что все немембранные органеллы имеют общее свойство - в их состав обязательно входят белки, содержащие структурно неупорядоченные домены. Благодаря поливалентности и высокой степени конформационной гетерогенности этих доменов, содержащие их белки способны конъюгировать с образованием фазового разделения жидкость - жидкость. Считается также, что одним из ключевых факторов, необходимых для осуществления фазового разделения является молекулярный краудинг.

Одним из наиболее характерных представителей класса внутренне неупорядоченных белков является протимозин альфа (ПроТа). ПроТа является низкомолекулярным (12кДа) ядерным белком с сильным отрицательным зарядом при физиологических условиях ($pI = 3.5$). В кариоплазме этот белок распределен неравномерно, а колоколизирован с такими немембранными органеллами как PML-тельца и cleavage тельца. Мы предполагаем, что благодаря своей неупорядоченной структуре ПроТа обладает способностью образовывать жидкие включения, а конформационные переходы, происходящие в ответ на изменение окружающих условий, являются основополагающими событиями в этом процессе.

Целью настоящей работы стало изучение влияния макромолекулярного краудинга на структуру внутренне неупорядоченного белка ПроТа. Для моделирования условий молекулярного краудинга *in vitro* использовали концентрированные растворы (80, 200 и 300 мг/мл) синтетического краудинг агента – полиэтиленгликоля, обладающего различным молекулярным весом (600, 4000 и 12000 Да). Было установлено, что в кислой области pH присутствие полиэтиленгликолей в растворе приводит к увеличению содержания в белке α -спиральной структуры. Наблюдаемый эффект определяется концентрацией краудинг агента, но не зависит от его молекулярной массы и гидродинамического радиуса. Это может быть обусловлено взаимным проникновением полимерных клубков друг в друга в изученном диапазоне концентраций полимера и, следовательно, уменьшением величины исключенного объема за счет изменения формы молекулы. Присутствие полиэтиленгликоля в растворе также способствует преципитации белка в области pI . Эффективность преципитации зависит от концентрации краудинг

агентов, что может быть связано с агрегацией незаряженного белка вследствие ограничения доступного объема. Нами было показано, что флуоресцентный зонд тиофлавин Т (ThT), используемый для диагностики образования амилоидных фибрилл связывается с полученными агрегатами. Однако, небольшое возрастание интенсивности флуоресценции ThT, зарегистрированной в растворах, содержащих агрегаты ПроТа по сравнению с растворами, содержащими амилоидные фибриллы, а также результаты электронной и конфокальной микроскопии свидетельствуют об аморфном характере этих надмолекулярных образований.

Таким образом, ограничение конформационной энтропии внутренне неупорядоченного белка ПроТа, вызванное присутствием краудинг агентов, не стимулирует образования фазового разделения жидкость-жидкость, но в некоторых условиях способствует формированию аморфных агрегатов. По всей видимости, взаимодействия белковых цепей друг с другом существенно превосходит взаимодействия между полипептидной цепью и растворителем в этих условиях, что приводит к преципитации белка. Мы полагаем, что получение жидких включений ПроТа в условиях молекулярного краудинга будет возможно при изменении соотношения интенсивностей между двумя типами взаимодействий: белок-белок и белок-растворитель, за счет модуляции таких параметров как температура, ионная сила, вязкость и полярность растворителя, заряд целевого белка и т.д.

Работа выполнена при поддержке РФФИ проект №16-04-01614 и № 18-34-00975 и стипендии президента РФ СП-841.2018.4.

НОВЫЕ ФУНКЦИИ БЕЛКА PCID2 В ЦИТОПЛАЗМЕ КЛЕТОК *DROSOPHILA MELANOASTER*. © А.А. Глухова, Д.В. Копытова. Институт биологии гена РАН, Москва, anapochta6@gmail.com, d_dmitrieva@mail.ru.

Транспортировка мРНК из ядра в цитоплазму клеток является сложным процессом, в котором участвуют множество белков и белковых комплексов. Для *Drosophila melanogaster* одним из таких комплексов является комплекс TREX-2. Он отвечает за движение мРНК от места транскрипции до ядерной поры. В дрозофиле этот комплекс состоит из трех субъединиц: Xmas-2, ENY2, PCID2. До настоящего времени функции белка PCID2 в клетках *Drosophila melanogaster* остаются неизученными.

Нами было показано, что белок PCID2 в ядре и в цитоплазме клеток существует в двух разных по размеру формах. Цитоплазматическая форма данного белка отличается по

размеру от ядерной, и мы показали, что данное увеличение размера белка вызвано убиквитинилированием. При помощи метода иммунопреципитации мы выяснили, что компоненты комплекса TREX-2 связываются только с ядерной формой белка. В связи с этим мы предположили, что белок PCID2, отвечает за сходные с TREX-2 функции и в цитоплазме, но меняет партнеров комплекса. Для решения данной проблемы мы очистили комплекс белка PCID2 из цитоплазматического эмбрионального экстракта. С помощью нескольких стадий хроматографической очистки и вестерн-блот анализа мы выделили и сконцентрировали цитоплазматическую фракцию, в которой содержится белок PCID2. Из полученной фракции с использованием антител к PCID2 нами был очищен белковый комплекс PCID2 и был определен его белковый состав. С помощью анализа MALDI-TOF MS был определен белок NudC. Нами были получены антитела к данному белку и подтверждены взаимодействия двух белков методом иммунопреципитации. Исходя из предположения, что комплекс PCID2-NudC участвует в транспорте цитоплазматической мРНК, при помощи метода иммунопреципитации мы показали, что PCID2 взаимодействует с белками цитоскелета и моторными белками, а именно, с альфа-тубулином и динактином. Также мы показали методом RIP-CHIP, что в комплексе PCID2-NudC только белок PCID2 способен связывать мРНК. Мы выяснили, что цитоплазматическая форма белка PCID2 существует только в присутствии белка NudC.

Таким образом, в ходе работы мы выяснили, что в S2 клетках *Drosophila melanogaster* белок PCID2 присутствует в двух формах: в ядерной фракции - около 41 кДа и в цитоплазматической - 45,2 кДа. Нами было детектировано взаимодействие легкой формы PCID2 с белками ENY2 и Xmas2. Мы показали, что белок PCID2, находясь в цитоплазме, уже не взаимодействует с компонентами экспортного комплекса TREX-2, но взаимодействует с белком NudC, моторными белками и компонентами цитоскелета, а также способен связывать мРНК, что подтверждает наше предположение о его транспортной роли мРНК в цитоплазме клеток *Drosophila melanogaster*.

Работа поддержана грантом программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ЭФФЕКТ ИНГИБИТОРА ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ
В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА. © О.О. Гнедина, М.В. Изотти,
В.А. Поспелов. Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, olga.o.gnedina@gmail.com.

Ранее нами было показано, что ингибитор гистоновых деацетилаз (HDI) бутират натрия (NaBut) вызывает блок клеточного цикла на границе фаз G1/S в эмбриональных фибробластах мыши, трансформированных онкогенами E1A и cHa-Ras (линия ERas), без признаков апоптотической гибели, а также преждевременное старение клеток. Отсутствие апоптотической гибели при действии HDI выделяет трансформанты ERas в ряду опухолевых клеточных линий. В связи с этим мы исследовали антипролиферативный эффект NaBut в опухолевых клетках человека с активированным Ras-сигнальным путем. Так клетки легочной карциномы A549 и карциномы толстого кишечника HCT116 экспрессируют мутантный активированный K-Ras, а в клетках рака кишечника HT29 и почек HEK293 гены *ras* сверхэкспрессированы, вследствие чего все четыре линии характеризуются активированным Ras- сигнальным путем. Методами проточной цитофлюориметрии и, изучая жизнеспособность клеток методом МТТ-анализа, мы показали, что NaBut индуцировал апоптотическую гибель в клетках HEK-293 и HCT-116, но не вызывал цитотоксического эффекта в клетках A-549 и HT-29. Была обнаружена корреляция индукции апоптотической гибели и модулированием фосфорилирования основной киназы, опосредующей сигнал от активированного Ras, киназы ERK. Так методом иммуноблоттинга было показано снижение фосфорилирования киназы ERK в клетках ERas, A-549 и HT-29 при продолжительных временах действия NaBut (более 48 ч). При этом в клетках HCT-116 и HEK-293, в которых NaBut индуцирует апоптоическую гибель, содержание фосфорилированной киназы ERK увеличивается. В литературе отмечалась роль киназы ERK в стимуляции апоптоза (CagnoletChambard, 2012DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x). Поэтому активация ERK в клетках HCT-116 и HEK-293 при действии NaBut является одним из возможных объяснений NaBut-опосредованного апоптоза.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА НАПРАВЛЕННОЙ ЭВОЛЮЦИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ. © Д.А. Горбачев, К.С. Саркисян, А.С. Мишин, К.А. Лукьянов. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, igorbatchev@icloud.com.

Флуоресцентный белок KillerRed – это первый генетически кодируемый фотосенсибилизатор, который при облучении светом способен производить активные формы кислорода. Данное свойство белка KillerRed широко используется для прицельной фотоинактивации клеточных белков. Однако, по сравнению с существующими

химическими фотосенсибилизаторами, KillerRed генерирует существенно меньшее количество активных форм кислорода и, как следствие, имеет более низкую фототоксичность.

На сегодняшний день многочисленные попытки увеличить фототоксичность KillerRed с использованием направленной эволюции и сайт-специфического мутагенеза оказались не результативными, так как клетки, экспрессирующие более фототоксичные варианты белка, погибают и не могут быть отобраны стандартными методами.

В нашей работе мы предлагаем метод, который позволяет проанализировать фототоксичность десятков тысяч мутантов белка KillerRed и выявить наиболее фототоксичные из них. Кроме того, наш подход будет применим к анализу библиотек других токсичных белков.

Помимо практических результатов в виде создания улучшенных вариантов белка KillerRed, наш подход позволяет получить обширный объем данных о влиянии десятков тысяч мутаций на свойства KillerRed. Полученные данные станут фундаментом для понимания структурных основ фототоксичности флуоресцентных белков, а также будут востребованы в таких областях биологии, как белковый дизайн и эволюционная биология.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00939.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКОГО ПОДХОДА ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНЫХ ПРИЖИЗНЕННЫХ НАБЛЮДЕНИЙ ЗА РАЗВИТИЕМ ВНУТРИЯДЕРНЫХ ПАРАЗИТОВ АМЕБ. © О.Ю. Гордецкая,¹ Е.С. Мезенцев,¹ Е.С. Насонова.^{1,2} ¹Санкт-Петербургский Государственный Университет, ²Институт цитологии РАН, г.Санкт-Петербург, *olgordya@gmail.com*.

Представители малоизученного вида облигатных паразитов *Nucleophaga amoebae* KTq2 (Rozellomycota: Opisthokonta) развиваются в свободноживущих амебах *Thetamoeba quadrilineata*. Эта паразит-хозяинная система сравнительно легко поддерживается в лабораторной культуре и представляет собой удобный модельный объект для изучения явления внутриядерного паразитизма у протистов.

В ходе исследования споры нуклеофаги добавляли в культуру амеб, через сутки изолировали зараженные клетки и отсаживали их индивидуально в камеры для микроскопии высокого разрешения (Eppendorf Cell imaging slides). Наблюдения проводили с использованием инвертированного микроскопа Leica DMI3000 оснащенного

оптикой Номарского. Клетки фотографировали каждые 12 ч на протяжении всего срока развития паразита.

Полный цикл развития паразита при +18°C занимает до 5 суток. Развитие начинается с попадания споры внутрь клетки хозяина. Механизм проникновения паразита в клетку хозяина и его дальнейшего попадания в кариоплазму неясен и требует дополнительных исследований. Самые ранние стадии паразита, наблюдаемые в ядре амебы на 2 сутки после заражения - одноядерные меронты (размером около 2 мкм), локализующиеся в центральной зоне ядра амебы, в районе ядрышка. Часто в ядре клетки хозяина происходит одновременное развитие нескольких паразитов. На 3 сутки наблюдается преобразование одноядерных меронтов в спорогональные многоядерные плазмодии. Они увеличиваются в размерах до 6-10 мкм, постепенно заполняя весь объем ядра хозяина, ядрышко последнего исчезает. На 4-5 сутки происходит преобразование плазмодиев в спорофорные пузырьки, содержащие многочисленные споры размером 2.5-2.8 мкм. Оболочка пузырька – по-видимому, дериват цитоплазматической мембраны плазмодия. От ядра хозяина на этом этапе остается лишь окружающая спорофорные пузырьки ядерная оболочка.

Таким образом, нам удалось длительное время наблюдать за индивидуальными зараженными клетками амеб, установить и документировать последовательность стадий развития паразита внутри ядра клетки хозяина. Этот подход может быть использован для идентификации и визуализации других подобных паразитов в культурах амеб.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-04-01359.

ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ ВО ВЗРОСЛЫХ КАРДИОМИОЦИТАХ МЫШИ. © Д.А. Грехнёв, В.А. Вигонт, К.О. Гусев, Е.В. Казначеева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, dima.grehnyov@yandex.ru.

Ионы кальция контролируют множество клеточных процессов от пролиферации и дифференцировки до сократительной способности миоцитов и апоптоза. Депо-управляемый вход кальция — важный и один из наиболее универсальных способов поступления кальция из внеклеточного пространства в цитозоль. Нарушения кальциевой сигнализации связаны с рядом патологий различной этиологии, включая нейродегенеративные заболевания, сердечно-сосудистые патологии, аллергии... В настоящее время бурное развитие получила область медицины, занимающаяся каналопатиями. Каналопатии — это группа заболеваний, связанных с неправильной работой ионных каналов. В последние годы сердечные патологии прочно занимают

первое место в списке причин, приводящих к летальному исходу. Для них, в частности, показано угнетение насосной функции сердца и развитие аритмий из-за дисфункции потенциал-зависимых кальциевых каналов и рианодинового рецептора. Однако вовлеченность депо-управляемого входа кальция в развитие сердечных патологий остается противоречивой. Появилось несколько работ, демонстрирующих нарушение работы кардиомиоцитов при дисфункциях STIM1 и белков семейств Orai и TRPC, традиционно относящихся к аппарату, обеспечивающему функционирование депо-управляемых каналов в различных клетках. На сегодняшний день практически отсутствуют данные электрофизиологических измерений депо-управляемого входа кальция в кардиомиоцитах как в норме, так и в случае патологий. В данной работе нам удалось впервые электрофизиологически зарегистрировать депо-управляемые кальциевые токи в первичной культуре вентрикулярных кардиомиоцитов, полученных из мышей дикого типа. Токи были индуцированы опустошением депо в результате действия тапсигаргина и кофеина. Полученные Вольт-Амперные характеристики соответствуют характеристикам широко известных депо-управляемых CRAC-каналов, образованных белками Orai. Также была показана чувствительность токов к известному блокатору CRAC-каналов 2-APB. Работа поддержана Грантом РНФ № 14-14-00720-П, стипендией Президента РФ.

"ИНДИВИДУАЛЬНАЯ И СОЦИАЛЬНАЯ ЖИЗНЬ" СТАРЕЮЩИХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. © А.А. Грюкова, П.И. Дерябин, А.В. Бородкина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, borodkina618@gmail.com.

Феномен клеточного старения впервые был описан как предел деления нормальных клеток в культуре. С момента первого упоминания и вплоть до недавнего времени основной акцент при изучении клеточного старения был сделан на внутриклеточных изменениях, сопровождающих этот процесс. Наибольшее внимание уделялось необратимой остановке пролиферации стареющих клеток и двум логично вытекающим физиологическим следствиям – супрессии канцерогенеза за счет ареста роста поврежденных клеток и ускорению организменного старения ввиду ухудшения репарации тканей с возрастом. Однако в настоящее время наблюдается смещение акцентов при исследовании клеточного старения: оказалось, что стареющие клетки через ауто/паракринный механизм могут влиять на клетки микроокружения, секретируя множество различных факторов, включая цитокины, хемокины, протеазы и ростовые

факторы. Такой профиль секретируемых стареющими клетками молекул получил название ассоциированного со старением секреторного фенотипа (senescence associated secretory phenotype, SASP). На сегодняшний день известно, что SASP опосредует участие стареющих клеток в самых разнообразных биологических процессах, включая регенерацию, ремоделирование тканей, эмбриогенез, воспаление и туморогенез.

Основным объектом наших исследований являются мезенхимные стволовые клетки человека, выделенные из десквамированного эндометрия. В настоящей работе на примере эндометриальных стволовых клеток предполагается кратко осветить «индивидуальные» внутриклеточные изменения, сопровождающие старение клеток, а также основные аспекты их «социальной жизни», а именно состав и функциональную роль ассоциированного со старением секреторного фенотипа. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

ИССЛЕДОВАНИЕ ОНКОГЕННЫХ СВОЙСТВ БЕЛКА PIRH2 В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА. © А.А. Дакс,¹ О.А. Федорова,¹ А.В. Петухов,^{1,2} О.Ю. Шувалов,¹ В.А. Мамонтова,¹ П.А. Старшова,¹ Н.А. Барлев.¹ ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ² ФГБУ "НМИЦ им. В.А. Алмазова" МЗ РФ, alexandra.daks@gmail.com.

Белок Pirh2 – продукт гена *RCHY1* человека – является RING-доменсодержащей Е3-лигазой, осуществляющей убиквитинирование онкосупрессора p53 и направляющей его на протеасомную деградацию. При этом p53 активирует экспрессию гена *RCHY1*, формируя замкнутую цепь обратной регуляции. Таким образом, являясь негативным регулятором p53, Pirh2 способствует канцерогенезу. Однако стоит отметить, что множество типов раковых опухолей характеризуется либо отсутствием p53, либо мутациями в нем, и роль белка Pirh2 в таких клетках изучена недостаточно.

Для более глубокого понимания роли Pirh2 в формировании туморогенного потенциала клеток мы использовали протеомный подход, в результате чего нами было идентифицировано более 200 новых интерактантов данной убиквитинлигазы. Нами показано, что Pirh2, по-видимому, играет ключевую роль в таких клеточных процессах, как регуляция клеточного цикла, ответ на генотоксический стресс и запуск программируемой клеточной гибели.

В ходе данного исследования мы выявили функциональную значимость взаимодействия Pirh2 и РНК-связывающего белка HuR. А именно, нами было продемонстрировано, что Pirh2 способен регулировать экспрессию таких генов-мишеней

белка NuR, как p27, циклин D и MDR1, за счет негативного влияния на его стабильность в клетке.

Мы также поставили перед собой задачу исследовать влияние белка Pirh2 на туморогенный потенциал клеток линии немелкоклеточного рака легкого человека H1299, в которой отсутствует p53. В результате мы обнаружили, что повышение экспрессии PIRH2 способствует увеличению скорости пролиферации и миграционного потенциала данных клеток, а также повышает их устойчивость к генотоксическому агенту доксорубину. При этом нокдаун Pirh2 с использованием малых шпилечных РНК вызывает обратный эффект. Мы также показали, что Pirh2 вызывает повышение экспрессии онкогена c-Myc как на уровне матричной РНК, так и на уровне белка, что может частично объяснить механизм Pirh2-индуцированного повышения туморогенного потенциала клеток.

Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что в клетках немелкоклеточного рака легкого человека H1299 Pirh2 является онкогеном и может рассматриваться как потенциальная мишень для разработки терапии p53-негативных опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 17-75-10198) и РФФИ (грант № 16-34-60228 мол_а_дк).

КОНСЕРВАТИВНОСТЬ БЕЛКОВ *LUX* ОПЕРОНА ПОЗВОЛЯЕТ УСТАНОВИТЬ СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ, ИГРАЮЩИЕ ВАЖНУЮ РОЛЬ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ БАКТЕРИЙ. © А.А. Деева,¹ Е.А. Зыкова,^{2,3} Е.В. Немцева,^{1,4} В.А. Кратасюк.^{1,4} ¹Сибирский федеральный университет, Красноярск, ²Институт биофизики клетки РАН, Пущино, ³Государственный научно-исследовательский институт информационных технологий и телекоммуникаций («Информика»), Москва, ⁴Институт Биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, adeeva@sfu-kras.ru.

Непрерывное свечение биолюминесцентных бактерий обеспечивается за счет консервативного ко-экспрессируемого набора генов, формирующего *lux* оперон. Давление отбора направлено на весь регион в целом в связи с тем, что гены расположены последовательно и их экспрессия регулируется совместно. Исследование консервативных участков *lux* оперона может пролить свет на функциональные характеристики биолюминесцентной системы бактерий, которые возникли в процессе видообразования.

Мы проанализировали полногеномные последовательности 23 видов светящихся бактерий из банка данных NCBI. В результате были отобраны аминокислотные последовательности белков, участвующих в биолуминесцентной реакции, а именно бактериальных люцифераз и оксидоредуктаз. Филогенетический анализ полученных данных показал, что бактериальные люциферазы формируют две клады, что хорошо согласуется с двумя эмпирически найденными группами «быстрых» и «медленных» люцифераз, каждой из которых соответствует определенный тип кинетики. Распределение консервативных участков различается у двух субъединиц люциферазы, что отражает их функциональные различия. Значительная часть консервативных участков альфа-субъединицы формирует активный центр, в то время как большая часть консервативных аминокислотных остатков бета-субъединицы вовлечена в обеспечение взаимодействия между субъединицами. Полученные результаты согласуются с данными о том, что основная роль бета-субъединицы заключается в стабилизации активной конформации фермента.

Последовательности оксидоредуктаз, закодированных в *lux* опероне (LuxG), менее консервативны, однако также наблюдается разбиение на две клады. Сравнительный анализ LuxG и близкого гомолога, оксидоредуктазы Fge, позволил установить, что ряд консервативных аминокислотных остатков, обеспечивающих связывание флавина, оказался вариабелен у LuxG. По-видимому, данная оксидоредуктаза стала менее специфична к субстрату, в результате эволюции в составе *lux* оперона.

Таким образом, по сравнению с люциферазой, другие белки биолуминесцентной системы бактерий менее консервативны, что может быть связано с наличием их аналогов, которые могут не менее эффективно выполнять соответствующие функции. Более того, способность люциферазы утилизировать различные алифатические компоненты может быть одним из факторов, влияющих на отбор.

НАПРАВЛЕННАЯ МОДИФИКАЦИЯ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОМОЩИ CRISPR-ТЕХНОЛОГИИ. © А.А. Грюкова, П.И. Дерябин, А.В. Бородкина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, grukova77@mail.ru.

На сегодняшний день предполагается, что положительное влияние мезенхимных стволовых клеток (МСК) при трансплантации обусловлено преимущественно их паракринной активностью. В подтверждение этой гипотезы большое количество данных

свидетельствует о терапевтическом эффекте использования кондиционированных сред МСК для лечения ряда заболеваний. Таким образом, возможность усиления полезных и устранения негативных последствий паракринной активности МСК является актуальной задачей в регенеративной медицине. Настоящее исследование было нацелено на разработку высокоспецифичного и эффективного подхода к модуляции секретома мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из эндометрия (эМСК). Среди существующих способов модификации секретома МСК технология редактирования генома CRISPR/Cas9 представляет собой один из самых точных и мощных инструментов. Для модуляции секретома эМСК последовательности sgRNA клонировали в CRISPR/Cas9 GeCKO (Genome-scale CRISPR Knock-Out) и CRISPR/Cas9 SAM (Synergistic Activation Mediator) системы, которые впоследствии использовали для продукции лентивирусов. Кондиционированные среды, собранные от модифицированных эМСК, были сконцентрированы и валидированы с помощью иммуноблоттинга.

Используя системы CRISPR/Cas9, мы смогли получить эМСК, нокаутные по белку PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1, ингибитор активатора плазминогена-1) и оверэкспрессирующие PAI-1. Таким образом, нам удалось собрать PAI-1-истощенные и PAI-1-обогащенные кондиционированные среды, что свидетельствует об эффективности выбранного подхода. В результате данного исследования нами впервые была продемонстрирована возможность успешной модификации секретома МСК с применением технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗВОРАЧИВАНИЯ ЛЮЦИФЕРАЗЫ *PHOTOBACTERIUM LEIOGNATHI* МОЧЕВИНОЙ МЕТОДОМ ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ.

© Д.В. Гульнов, Е.В. Немцева, В.А. Кратасюк. ¹Сибирский федеральный университет, Красноярск, dmivalgul@gmail.com.

Разработка экспериментальных методов детекции промежуточных состояний белка в ходе сворачивания/разворачивания является одной из актуальных задач молекулярной биофизики. Время-разрешенная флуоресцентная спектроскопия белков может быть использована для её решения.

В данной работе исследовали равновесную денатурацию люциферазы *Photobacterium leiognathi* мочевиной оптическими методами, включающими круговой дихроизм, стационарную и время-разрешенную флуоресценцию. Целью исследования

являлось сравнение кривых перехода люциферазы *Photobacterium leiognathi*, определенных различными методами, с опубликованными данными для люциферазы *Vibrio harveyi*. Кроме того, в работе проведено тестирование новых информативных параметров для обнаружения стадий денатурации, таких как компоненты времени жизни собственной флуоресценции белка.

Установлено, что собственная флуоресценция люциферазы, обусловленная наличием в составе семи триптофановых остатков, характеризуется тремя временами жизни, которые при разворачивании изменяются в диапазоне: 4,5–6,2, 1,8–2,2 и <0,3 нс. Были обнаружены два перехода, что соответствует трехстадийному механизму разворачивания, предложенному ранее для люциферазы *Vibrio harveyi*. Первый переход происходит при концентрации мочевины 1–2 М. Он обнаруживается по изменению среднего времени жизни и интенсивности «красного» края стационарных спектров флуоресценции (>390 нм). Рост интенсивности при длине волны около 320 нм, который также служил показателем данного перехода для люциферазы *Vibrio harveyi*, менее выражен для изучаемого фермента. Это можно объяснить отсутствием в структуре люциферазы *Photobacterium leiognathi* α Trp131, расположенного внутри белковой глобулы фермента *Vibrio harveyi*.

Было показано, что второй переход происходит при концентрации мочевины 4,5–6 М. Он наиболее выражен для «длинного» времени жизни флуоресценции, но также может быть обнаружен методами кругового дихроизма (при 222 нм) и флуоресцентной спектроскопии при стационарном возбуждении (по изменению положения максимума спектра и параметра I_{320}/I_{360}). Получено, что в отличие от люциферазы *Vibrio harveyi*, переходящей в полностью развернутое состояние уже при 5 М мочевины, исследованная люцифераза отличается большей стабильностью по отношению денатурирующему действию мочевины.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки РФ (государственное задание на выполнение работ, проект №6.7734.2017/БЧ).

РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ЭФФЕКТИВНОЙ СБОРКИ ЛЕНТИВИРУСОВ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. © П.И. Дерябин, А.А. Грюкова, А.В. Бородкина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, pavel_deryabin@list.ru.

Использование рекомбинантных лентивирусных систем является одним из наиболее распространенных подходов генетической модификации клеток человека. В контексте экспериментальной клеточной биологии лентивирусная трансдукция обладает рядом практических преимуществ, включая высокую эффективность инфекции большинства клеточных типов, стабильную и высокую экспрессию трансгена и малую токсичность для клеток. Однако техническая реализация этого подхода, а именно получение нужного количества вирусных частиц, до сих пор остается достаточно сложной практической задачей. В связи с этим, целью настоящей работы была разработка конкретного практического протокола эффективной сборки лентивирусных частиц с высоким титром для последующей трансдукции эндометриальных мезенхимальных стволовых клеток человека. Были подобраны условия для эффективной и нетоксичной трансфекции пакующей клеточной линии НЕК293Т с использованием полиэтиленимина 25 кДа, а также определены оптимальные условия сборки вирусных частиц, наиболее важными из которых оказались использование пакующих плазмид II поколения psPAX2 и pMD2, дополнение питательной среды в процессе сборки 1 mM NaB и фильтрация вирусных культуральных жидкостей с полиэфирсульфовыми фильтрами. Так же, для дополнительной очистки вирусных растворов была использована «сахарозная подушка». Оптимизированный протокол позволяет воспроизводимо получать вирусные стоки с титром $> 2 \cdot 10^7$ TU/ml. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ DDX 5 (РНК-ХЕЛИКАЗЫ p68), СВЯЗЫВАЮЩЕЙ ТАНДЕМНЫЕ ПОВТОРЫ, В ООГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ. © *А. Добрынин,^{1,2,3} А.С. Калугина,² Г.Н. Почукалина,¹ Н.М. Корчагина,^{2,3} Н.И. Енукашвили.¹* ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Клиника репродукции человека АВА-ПЕТЕР, Санкт-Петербург, ³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, *dobrmakl555@mail.ru.*

Оогенез млекопитающих – сложный процесс, в котором происходит, в том числе, накопление неcodирующих РНК тандемных и диспергированных повторов, а также белков, регулирующих их транскрипцию. Эти транскрипты и белки-регуляторы необходимы в раннем эмбриогенезе. В нашей лаборатории был выделен и охарактеризован белок DDX5 (РНК-хеликаза p68), связывающийся с тандемными повторами человека и мыши и участвующий в регуляции транскрипции таких повторов. В

раннем эмбриогенезе мыши показано, что часть пула данного белка ассоциирована с тандемными повторами. В ооцитах человека и мыши локализация DDX5 ранее не исследовалась.

Цель работы - определение локализации DDX5 в оогенезе мыши и человека. Оогонии мыши получали из эмбрионов 10–15 дней внутриутробного развития. Для получения преовуляторных ооцитов мышей (germinal vesicle oocyte, GV) проводили пункцию антральных фолликулов половозрелых, нестимулированных мышей. Для получения постовуляторных ооцитов мыши (MII) проводилась стимуляция мышей в возрасте 6–10 недель. В экспериментах с оогониями человека материал получали из эмбрионов 19–25 недель внутриутробного развития (прерывание беременности по медицинским показаниям). При работе с преовуляторными (GV и MI) ооцитами человека, исследовали клетки, полученные в стимулированных циклах доноров, методом фолликулярной пункции. Незрелые ооциты (GV, MI) не используются для банкинга и переданы для исследований. Согласие доноров получено. Все ооциты фиксировали 4 % ПФА, пермеабелизовали 0,5 % Triton X-100, окрашивали антителами (АТ) против белка DDX5.

После окрашивания АТ к DDX5 в оогониях мыши в цитоплазме и ядре выявлялись ярко окрашенные гранулы. В преовуляторном ооците (GV) DDX5 выявляется в составе постъядрышка (ПЯ). При разборке ПЯ и переходе к стадии постовуляторного ооцита (MII) DDX5 локализован в виде отдельных точек в цитоплазме. На всех исследованных этапах оогенеза мыши DDX5 не был ассоциирован ни с прицентромерным, ни с центромерным гетерохроматином.

В оогониях человека, после окраски антителами на DDX5, а также в преовуляторных ооцитах на стадии GV и MI, были показаны разнородные структуры, диаметром от 1 до 8 мкм, локализованные в цитоплазме. Также, как и у мыши, белок не был ассоциирован ни с прицентромерным, ни с центромерным гетерохроматином ни на одном из рассматриваемых этапе оогенеза.

Мы предполагаем, что в ходе оогенеза происходит первичное накопление белка DDX5 в виде гранул различного размера в ядре и цитоплазме ооцита.

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* КЛЕТОК БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ С ЦЕЛЬЮ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИХ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ. © К.Э. Журенков,^{1,2} О.И. Александрова,² И.О. Гаврилюк,³ Ю.И. Хорольская,² Г.А. Писугина,^{1,2} Т.В. Машель,^{2,4} Д.А. Переплетчикова,^{2,4} М.И. Блинова.² ¹ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский

государственный университет, Санкт-Петербург, ²ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ³ФГБОУ ВО ВМА им. С.М.Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, ⁴ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, *kirill.zhurenkov.97@mail.ru*.

В настоящее время одной из актуальных задач регенеративной медицины в области офтальмологии является разработка клеточно-тканевых конструкций искусственной роговицы. Наиболее подходящим источником клеточного компонента для таких конструкций являются стволовые клетки лимба. Однако, сложности получения аутологичного материала и дефицит донорского стимулируют исследования по поиску альтернативных клеточных источников. На сегодняшний день рассматривают возможность использования для этих целей стволовых клеток буккального эпителия. Буккальный эпителий подобно эпителию роговицы является многослойным неороговевающим эпителием. Кроме этого, данный источник клеток позволяет использовать аутологичный материал, забор которого не сопряжён с рисками для здоровья пациента. Однако, в настоящее время нет хорошо отработанных методов по получению и культивированию стволовых клеток буккального эпителия.

Целью настоящего исследования явилась отработка оптимальных условий выделения, культивирования и криосохранения стволовых клеток буккального эпителия, а также характеристика клеток в полученной культуре и определение преимуществ данного типа клеток по сравнению с другими для дальнейшего использования в регенеративной медицине.

Для введения в культуру *in vitro* использовали биоптаты буккального эпителия кролика породы шиншилла. Выделение клеток осуществляли ферментативным и миграционным способами. Культивирование стволовых клеток буккального эпителия проводили на протяжении 2-х пассажей с последующей криоконсервацией клеток. Кроме того, исследовали возможность длительного культивирования полученной популяции клеток. Характеристику популяции проводили с использованием методов цитофлуориметрии.

В настоящей работе мы получили поддерживаемую в условиях *in vitro* популяцию стволовых клеток буккального эпителия и выявили особенности культивирования клеток данного типа. Проведённое исследование показало, что буккальный эпителий может являться вероятным источником стволовых клеток для создания клеточно-тканевых конструкций.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ 14-50-00068.

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ АГУТИ-МЫШЕЙ (A^y/a) С МЕЛАНКОРТИНОВЫМ ТИПОМ ОЖИРЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ АМФ-АКТИВИРУЕМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ И СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ В ГИПОТАЛАМУСЕ. © И.И. Зорина, И.О. Захарова, К.В. Деркач, Л.В. Баюнова, И.В. Романова, А.О. Шпаков. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, carry111@yandex.ru.

Вследствие мутации в локусе *Agouti* (A^y) у агути-мышей повышается экспрессия агути-сигнального пептида, антагониста меланокортинового рецептора 4-го типа, что приводит к подавлению гипоталамического меланокортинового сигналинга и развитию ожирения и инсулиновой резистентности. Агути-мыши являются наиболее подходящей моделью для изучения меланокортинового ожирения у людей, вызываемого генетическими факторами. Эффективных подходов для лечения меланокортинового ожирения в настоящее время не разработано. Перспективным может оказаться лечение метформином (МФ), который снижает массу тела и улучшает энергетический гомеостаз при сахарном диабете 2-го типа. В последние годы обнаружено, что, наряду с действием на периферические органы и ткани, МФ влияет на активность гипоталамических нейронов. В связи с этим можно предположить, что он способен восстанавливать нарушения в сигнальных и эффекторных системах гипоталамуса при метаболических расстройствах, что и определяет его терапевтический эффект. Цель работы состояла в изучении влияния 10-ти дневной обработки агути-мышей с помощью МФ (600 мг/кг/день) на метаболические и гормональные показатели, а также на активность АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК), энергетического сенсора клеток, Akt-киназы и транскрипционного фактора STAT3, эффекторных компонентов лептинового и инсулинового сигналинга. Обработка МФ снижала массу тела и жировой ткани, уровни глюкозы, инсулина и лептина, улучшала толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину. В гипоталамусе агути-мышей в сравнении с контрольными C57Bl/6J (a/a) мышами было повышено Thr¹⁷²-фосфорилирование $\alpha 1/2$ -субъединиц АМФК и соотношение фосфо-Thr¹⁷²/фосфо-Ser^{485/491} для АМФК, а также Tyr⁷⁰⁵-фосфорилирование STAT3, что свидетельствует о гиперактивации АМФК и повышение активности STAT3-регулируемых каскадов. При этом фосфорилирование Akt-киназы по остаткам Ser⁴⁷³ и Thr³⁰⁸ у агути-мышей не менялось. Обработка агути-мышей МФ приводила к нормализации фосфо-Thr¹⁷²-АМФК, не влияла на повышенный уровень фосфо-Tyr⁷⁰⁵-STAT3 и повышала Ser⁴⁷³-фосфорилирование Akt-киназы. Полученные данные

указывают, что длительная обработка агути-мышей МФ снижает до контрольного уровня активность АМФК, нормализуя энергетический статус гипоталамических нейронов, а также усиливает лептиновые и инсулиновые сигнальные пути, повышая активность 3-фосфоинозитидного пути, эффекторным компонентом которого является Akt-киназа, и сохраняя на высоком уровне активность STAT3-сигнального пути. Восстанавливающее влияние МФ на функциональное состояние гипоталамических нейронов может быть одним из механизмов улучшения метаболических и гормональных показателей при лечении этим препаратом агути-мышей. Работа поддержана грантом РФФИ (№ 16-15-10388).

ТАНДЕМНЫЕ ПОВТОРЫ *IN SILICO* И *IN SITU* В ГЕНОМЕ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА *CRICETULUS GRISEUS*. © Н.Г. Иванова, Д.И. Остромышенский, О.И. Подгорная. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, nadyaxs@gmail.com.

Тандемные повторы (ТП) – минимально изученный и максимально изменчивый компонент генома, вплоть до возможной видоспецифичности. Для наблюдений за быстрой изменчивостью ТП в качестве модельного организма использовали китайского хомячка *Cricetulus griseus*. С помощью ранее разработанных методов (Komissarov et al., 2011; Михеев и др., 2015) нашли *in silico* ТП в трех сборках генома *C.griseus*. Предсказания биоинформатики *in silico* нуждаются в проверке *in situ*. Для анализа использовали сборку АРМК, сделанную на основе секвенирования ДНК сортированных хромосом, что позволяет предсказать распределение ТП по хромосомам. Оценили содержание ТП в геноме путем выравнивания исходных ридов полногеномного секвенирования *C.griseus*, доступных в базах данных, на найденные поля ТП. 11 наиболее представленных в геноме ТП с помощью FISH (флуоресцентной гибридизации *in situ*) картировали на хромосомах *C.griseus* (2n=22). Для гибридизации использовали короткие синтетические одноцепочечные нуклеотидные зонды, специфичные для каждого исследуемого семейства ТП. Распределение сигнала сильно отличается от предыдущих изученных в нашей группе животных (мышь, свинья, сирийский хомяк). Все зонды к ТП, кроме одного (CG-24B) дают очень сильный сигнал в центромерном (ЦЕН) районе 5-й пары хромосом и в ЦЕН одной из других пар, обычно - на мелких метацентриках. Зонд к CG-24B дает сигнал в ЦЕН 7-й хромосомы. Только один из ТП — CG-84A дает сигнал больше чем на половине хромосом. Этот ТП расположен в ЦЕН 7-ми пар хромосом с

максимальным сигналом на паре мелких метацентриков. Сила сигналов варьирует у разных проб, свидетельствуя о количественном различии содержания ТП на разных хромосомах. Но, в отличие от домового мыши или сирийского хомяка, ни одна проба не дает сигнала на всех хромосомах, что свидетельствует об отсутствии общего для всего генома мажорного ТП. Причиной этого могут быть особенности кариотипа *C.griseus*, препятствующие гомогенизации ТП между хромосомами. Китайский хомячок оказался уникальным как по кариотипу, так и по составу классифицированных и картированных *in situ* ТП.

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ МИТОХОНДРИЙ КАРДИОМИОЦИТОВ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА СЕРДЦА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ. © М.С. Иванова, И.С. Андреев, А.В. Степанов, Г.А. Сакута, Е.В. Байдюк. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, miss.vanowa@yandex.ru.

Сердечная мышца является одним из активных потребителей кислорода, и его недостаток вызывает значительные нарушения структуры и функции миокарда. Наиболее чувствительными к гипоксии структурами клетки являются митохондрии. Показано, что изменения морфологии митохондрий коррелируют с патофизиологией хронической сердечной недостаточности. При этом при различных патологиях сердца в разной степени повреждаются разные субпопуляции митохондрий. В данной работе с помощью электронно-микроскопического исследования проведен морфометрический анализ межмиофибриллярной, перинуклеарной и субсарколеммной субпопуляций митохондрий кардиомиоцитов левого желудочка сердца крыс через шесть месяцев после экспериментального инфаркта миокарда, вызванного перманентным лигированием левой коронарной артерии. Показано, что в норме площадь межмиофибриллярных митохондрий составляет $0,516 \pm 0,027$ мкм² и превышает площадь околядерных и субмембранных митохондрий на 40% и 30% соответственно. У крыс с хронической сердечной недостаточностью различия в размерах митохондрий между субпопуляциями сглаживались. Площадь субмембранных и перинуклеарных митохондрий увеличивалась в 1.5 раза, тогда как площадь межмиофибриллярных митохондрий в среднем увеличивалась лишь на 30%. Изменения структуры крист при патологии выявлялись во всех субпопуляциях митохондрий, особенно в кардиомиоцитах периинфарктной зоны.

ПРОТЕКТОРНАЯ РОЛЬ ДРОЖЖЕВОГО КРАСНОГО ПИГМЕНТА ПРИ АПОПТОЗЕ. © П.А. Иванова,^{1,2} А.В. Артемов,² О.В. Невзглядова,² Т.Р. Сойдла.² ¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра великого, ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *polani20@mail.ru*.

Считается, что гибель нейронов при нейродегенерации протекает по типу апоптоза за счет накопления в клетках избыточного количества активных форм кислорода (АФК). В данной работе на дрожжевой модели изучался апоптоз, вызываемый проклонированными генами, кодирующими чужеродные белки: альфа-синуклеин, полиглутамин (*Q103*). Дegradацию белков при наступившем апоптозе отслеживали по снижению GFP-флуоресценции. Нами было показано, что присутствие красного пигмента (КП) в среде приводит к продлению начальной стадии апоптоза, когда белок еще полностью не деградировал, но клетки уже проницаемы для пропидия йодида (PI), окрашивающего мертвые клетки. При этом накопление АФК также снижается. Кроме того, протекторная функция пигмента проявлялась при индукции апоптоза старением и воздействием уксусной кислотой. Также в опытах *in vitro* подтверждена способность красного пигмента защищать модельные белки от деградации.

Из литературы известно, что способность различных белков образовывать токсичные для клеток агрегаты обусловлена их связью с металлами и может снижаться под воздействием молекул-хелатов. Мы показали, что если дрожжевые клетки выращивать в присутствии красного пигмента, а потом индуцировать у них экспрессию синуклеина или полиглутаминов, то токсичность этих белков оказывается сниженной. Это позволяет предположить, что в основе протекторной функции красного пигмента может лежать его хелаторная способность.

СТРУКТУРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ КАПСУЛЫ КАРИОСФЕРЫ И ОСТАТОЧНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ В ПОЗДНИХ ВИТЕЛЛОГЕННЫХ ООЦИТАХ *RANA TEMPORARIA*. © Н.В. Ильичева,¹ Д.Ю. Кирюшина,² Л.С. Адонин,^{1,3} Г.Н. Почукалина,¹ О.И. Подгорная.^{1,2,3} ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, ³Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, *nad9009@yandex.ru*.

В ооцитах многих животных на стадии диплотены I мейотического деления формируется кариосфера, которая представляет собой результат концентрации всех хромосом клетки в ограниченном объеме ядра. Образование кариосферы связано с инактивацией транскрипционной активности хромосом. У травяной лягушки *Rana temporaria* кариосфера окружена внешней капсулой, состоящей из волокнистого компонента, в который включены многочисленные белковые тельца. Целью настоящей работы было исследование молекулярного состава капсулы кариосферы (КК) и транскрипционной активности ооцитов *Rana temporaria* V и VI стадий развития. Методом непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания в волокнистом компоненте КК обнаружены структурные белки (актин, ламины A/C и B, TRF2, нуклеопорины Nup93 и Nup53), белки, связанные с ремоделированием хроматина (ATRX, TopoII). Белки SC35, коилин, TRF2 обнаружены в тельцах Кахаля. Компоненты мяРНП присутствуют в волокнистом компоненте капсулы и в В-спермосомах, начиная с V стадии развития ооцита. Характерна динамика в распределении мяРНП на V и VI стадиях. На V стадии мяРНП, наряду с наличием их в капсуле, выявляются в самой кариосфере, в непосредственной близости от конденсированных хромосом. На VI стадии подобной локализации мяРНП в кариосфере не наблюдается. С помощью микроинъекций BrUTP показано, что на V стадии хроматин сохраняет остаточную транскрипционную активность, в то время как на VI стадии включение BrUTP практически отсутствует. Локализацию транскриптов, синтезированных в ядре ооцита на V стадии, определяли методом FISH. РНК, транскрибируемая в ооците на V стадии, остается в ядре и распределяется по волокнистому компоненту КК. Таким образом, КК может быть вовлечена в процессы, связанные с транскрипцией хроматина на поздних стадиях оогенеза. Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология", грантов РФФИ (№ 15-04-01857) и РНФ (№ 15-15-20026).

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ БИОТЕСТИРОВАНИЕ ПОЧВ: СРАВНЕНИЕ
 ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ТОКСИКАНТАМ МОНО-, БИ- И ТРИ-ФЕРМЕНТНОЙ
 СИСТЕМ. © О.В. Искорнева, А.Е. Лисица, В.С. Матвиенко, Е.М. Колосова, Е.В. Немцева,
 Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк. ФГАУ ВО Сибирский Федеральный Университет,
 Красноярск, aliska.aliska.lis@mail.com.

На сегодняшний день остро стоит проблема загрязнения окружающей среды. Поэтому актуальной задачей нашего времени является разработка методов оценки уровня токсичности веществ, а также степени загрязнения природных и хозяйственных сред. Перспективным методом для решения этой задачи является метод ферментативного биотестирования.

В данной работе исследовали возможности использования ферментативных систем разной сложности в качестве биотестов для оценки степени загрязнения почв. Для этого определяли чувствительность моно-, би- и три- ферментной систем к пестицидам и ионам тяжелых металлов в воде и водных экстрактах из почв, различающихся гранулометрическим составом и содержанием гумуса. Объектом исследования служили NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза светящихся бактерий (R), системы редуктаза + бактериальная люцифераза (R+L) и лактатдегидрогеназа + редуктаза + люцифераза (LDH+R+L). Активность R измеряли спектрофотометрически, биферментной системы R+L и триферментной системы LDH+R+L – по интенсивности свечения билюминесцентной реакции. Для каждого тестируемого образца получали токсикологические параметры EC₂₀ и EC₅₀.

Установлено, что повышение сложности системы (от моно- до три- ферментной) в несколько раз увеличивает чувствительность ферментативного биотеста. Параметр EC₂₀ для ионов меди в воде составляет 80 мкг/л для R, 12 мкг/л для R+L и 0,8 мкг/л для LDH+R+L. Водные экстракты из почв оказывают слабое влияние на активность R (за исключением чернозема), но снижают чувствительность фермента к токсикантам, растворенным в этих экстрактах. Би- и три- ферментные системы значительно ингибируются чистыми экстрактами из почв тяжелой суглинков и чернозем, и чувствительность к токсикантам в них снижается.

Полученные результаты говорят о возможности увеличения чувствительности ферментативных биотестов к токсикантам в почве за счёт удлинения цепи сопряжения ферментов. Действие чистых экстрактов из почв на ферменты разных типов различается, что создаёт возможность конструирования специализированных ферментативных биотестов.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (№16-14-10115).

КОМБИНИРОВАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ И ДОКСОРУБИЦИНА НА МОЛЕКУЛУ ДНК. © Н.Е. Кайданов,¹ В.В. Клименко,^{1,4} А.К. Емельянов,¹ С.В. Шмаков,¹ Н.А. Князев,^{1,2} А.А. Богданов.^{3,4,5} ¹Санкт-Петербургский Академический Университет РАН, Санкт-Петербург, ²Институт Цитологии, Санкт-Петербург, ³ Санкт-Петербургский Ядерный Институт, Гатчина, ⁴Лаборатория Бионики, ИТМО, Санкт-Петербург, ⁵Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический), Санкт-Петербург, *kaydanov1997@gmail.com*.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) — эффективный и малотоксичный способ лечения многих онкологических заболеваний. Основным механизмом ФДТ заключается во взаимодействии возбужденной молекулы фотосенсибилизатора с молекулярным кислородом ($^3\text{O}_2$), чтобы произвести синглетный кислород ($^1\text{O}_2$). Считается, что синглетный кислород является основным цитотоксическим веществом в ФДТ. В данной работе мы исследуем совместное влияние цитостатика доксорубицина и фотодинамической терапии на репликационную активность ДНК. Это комплексное влияние мы сравниваем с отдельным эффектом только от ФДТ и эффектом только от обработки ДНК Доксорубицином.

Доксорубицин. В эксперименте использовалась линейка концентраций доксорубицина (Доксорубицин-Тева, Нидерланды) от 0.1 μM до 40 μM . В экспериментах использовалась одноцепочечная кДНК, полученная из клеток k-562. Растворы ДНК инкубировались с доксорубицином в течение 1 часа, затем производилась ПЦР и гель электрофорез анализ. Было показано, что полное ингибирование репликации ДНК происходит при концентрации препарата $[\text{DOX}] = 20 \mu\text{M}$. $\text{IC}_{50} = 5 \mu\text{M}$.

ФДТ. Подготовленные растворы ДНК с концентрацией фотосенсибилизатора $[\text{PS}] = 5 \mu\text{M}$ облучались лазером с длиной волны $\lambda = 662 \text{ nm}$, мощностью $P = 20 \text{ mW/cm}^2$ и разной длительностью облучения. Была показана дозовая зависимость репликационной активности ДНК.

ФДТ + Доксорубицин. Подготавливался раствор ДНК с доксорубицином с концентрацией $[\text{DOX}] = 5 \mu\text{M}$ и инкубировался в течение 1 часа. Затем в раствор добавлялся фотосенсибилизатор с концентрацией $[\text{PS}] = 5 \mu\text{M}$ и раствор облучался с мощностью $P = 20 \text{ mW/cm}^2$ и разной длительностью облучения.

Из рисунка 1.3 видно, что при добавлении доксорубицина к ФДТ не наблюдается аддитивного эффекта. Напротив, при некоторых дозах облучения совместное влияние Доксорубицина и ФДТ оказалось менее эффективным в нарушении репликации ДНК, чем

отдельно примененная ФДТ. Таким образом, наблюдается конкурентное воздействие доксорубицина и ФДТ. Мы предполагаем, что это связано с тем, что доксорубицин связывается с ДНК и закрывает сайты связывания ДНК с синглетным кислородом, так как известно, что синглетный кислород окисляет G-C пары и доксорубицин связывается с G-C парами [3].

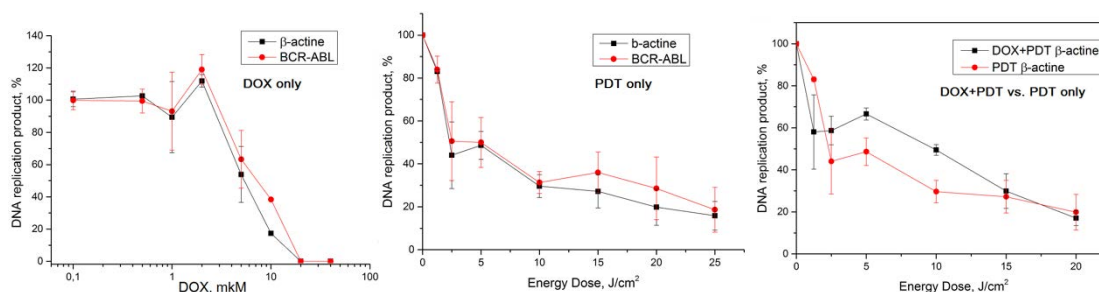


Рис. 1. График зависимости репликационной активности ДНК при (слева направо): 1) обработке доксорубицином; 2) фотодинамической терапии; 3) совместной обработке доксорубицином с последующей фотодинамической терапией (и сравнение с воздействием только ФДТ)

Литература

1. Agostinis, P et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update, 2011
2. M.J. Davies, Biochem Biophys Res Commun, 2003
3. X. Chen et al. Chemistry Select 2016, 1, 3823

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-04-01858 а.

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТЫ *PROROCENTRUM MINIMUM*. ©
В.О. Калинина, М.А. Бердиева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
verakamakalinina@gmail.com.

Считается, что у динофлагелляты *P. minimum* отсутствует половой процесс, так как он до сих пор не был описан. Тем не менее, у близкого вида *Prorocentrum micans* жизненный цикл достаточно подробно изучен и было показано, что стресс, такой как недостаток питательных веществ, стимулирует переход от вегетативной стадии цикла к половому процессу (Bhaud et al., 1988). Логично предположить, что жизненный цикл *P. minimum* может регулироваться сходным образом.

Культура *P. minimum* содержалась в стандартной среде f/2 для морских водорослей в течение 10 недель. Среда не обновлялась и дополнительные питательные вещества не вносились. В другом эксперименте, клетки *P. minimum* культивировались в среде f/2, с недостаточным количеством азота (NO_3^-) и/или фосфора (PO_4^{3-}). Каждую неделю со дна колбы отбиралась проба клеток, которая затем фиксировалась в 2% параформальдегиде, ядра окрашивались DAPI. Форма, размеры клеток и ядер анализировались с помощью световой микроскопии, программ imageJ и Excel.

Было установлено, что в отсутствие дополнительных источников питания, гетерогенность популяции в культуре *P. minimum* возрастает с течением времени. Примерно через 7 недель после начала эксперимента возрастает количество клеток с относительно крупными ядрами (предположительно полиплоидов), появляются клетки необычной формы, имеющие до трех ядер и ассиметрично делящиеся клетки. Более того, встречаются клетки, связанные в районе жгутикового кармана по 4, напоминая последнюю стадию мейотического деления. Тот же процесс наблюдался в эксперименте с недостаточным количеством азота и фосфора уже через 2 недели. Мы сопоставили наши результаты с данными, полученными при исследовании *P. micans* и обнаружили, что многие необычные формы *P. minimum* морфологически совпадают со различными стадиями жизненного цикла *P. micans*. Таким образом, можно предположить, что у *P. minimum* существует половой процесс, а именно слияние двух клеток, образование зиготы и последующие синхронные или асинхронные деления мейоза. Однако, эта гипотеза требует дальнейших исследований.

Финансовая поддержка РФФИ, проект 16-14-10116.

ДОЛЯ CD146⁺ КЛЕТОК В ПОПУЛЯЦИИ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК СНИЖАЕТСЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭФР. © Р.С. Каменцева,¹ В.В. Кошеверова,¹ М.В. Харченко,¹ М.В. Истомина,³ О.М. Семенов,² А.Н. Шатрова,¹ О.Г. Люблинская,¹ А.П. Домнина,¹ Е.С. Корнилова.^{1,2,3} ¹Институт цитологии РАН, ²Санкт-Петербургский государственный университет, ³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, rkamentseva@yandex.ru.

Выделяемые из различных тканевых источников мезенхимные стромальные клетки (МСК), как правило, представляют собой довольно гетерогенную по экспрессии поверхностных маркеров популяцию клеток. Одним из предполагаемых маркеров МСК многие исследователи считают CD146, также известный как МСАМ (молекула клеточной

адгезии меланомы), причем согласно недавним исследованиям этот маркер экспрессирует часть популяции МСК, обладающая большими пролиферативным потенциалом и способностью к дифференцировке по сравнению с CD146⁻ клетками.

Мы показали, что клетки линии эндометриальных МСК (эМСК), охарактеризованной Группой генетических механизмов дифференцировки и малигнизации клеток ИНЦ РАН (Земелько и др., 2011), содержат около 50% CD146⁺ клеток. Кроме того, ранее нами было показано, что эМСК экспрессируют рецептор эпидермального фактора роста (ЭФР), роль которого мало изучена в МСК. В данной работе мы оценили влияние ЭФР и другого лиганда рецептора ЭФР, трансформирующего ростового фактора-альфа (TGF- α), на пролиферацию эМСК и экспрессию в них CD146. Под действием этих лигандов пролиферация эМСК усиливалась, но при этом количество CD146⁺ клеток значительно снижалось. Также мы показали, что этот эффект не зависит от увеличения плотности клеток, связанного с усилением пролиферации. Полученные данные позволяют предположить, что CD146⁺ и CD146⁻ субпопуляции эМСК могут в разной степени отвечать на активацию рецептора ЭФР. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00188 и при финансовой поддержке ФАНО.

РАЗРАБОТКА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО СОСУДА МАЛОГО ДИАМЕТРА. © В.Б. Карпович,^{1,2} Ю.А. Нащекина,¹ М.И. Блинова,¹ П.О. Никонов,¹ Г.И. Попов,² Н.М. Юдинцева.¹ ¹ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, *kviccy@gmail.com*.

Главной причиной инвалидизации и смертности населения по данным ВОЗ, являются заболевания сердечно-сосудистой (СС) системы. Основным способом лечения СС заболеваний, связанных с облитерацией кровеносных сосудов, являются операции с использованием аутовен/аутоартерий. Однако отсутствие аутологичного материала приводит к необходимости использования альтернативных сосудистых протезов. Несмотря на доступность и удобство в применении, синтетические и биологические протезы малого диаметра (< 6 мм) имеют такой серьезный недостаток, как высокий риск быстрой облитерации в результате обширной гиперплазии неоинтимы или тромбообразования. Таким образом, целью работы является создание тканеинженерного сосуда (ТИС) малого диаметра на основе полимерного скаффолда, заселенного клетками.

Материалы и методы. Для создания ТИС использовали два полимера: на основе молочной кислоты – Poly-L-lactic acid (PLL) и Poly-ε-caprolactone (PC), которые обладают рядом необходимых свойств. В PLL-сосуды вносили суспензию МСК и культивировали 7 дней в стандартных условиях. Оценку присутствия и состояния клеток в сосуде выполняли с помощью метода иммунофлуоресценции. Бесклеточный PC-сосуд был вшит в брюшную аорту крысы, интраоперационно кровоток восстановлен. Животное выведено из эксперимента на 7-ые сутки. Оценку присутствия и состояния клеток в сосуде выполняли с помощью гистологического исследования.

Результаты и выводы. Бесклеточный PC-сосуд вызвал развитие неспецифического продуктивного воспаления и сопровождался фагоцитозом его материала гистиоцитами. Эндотелизация на 7-е сутки достигла около 17% от длины протеза. Формирование неоинтимы в эти сроки отсутствовало. Материал скаффолда не вызывал заметного образования пристеночных микротромбов в просвете магистральной артерии. Представляется перспективным дальнейшее использование PC-сосуда в качестве скаффолда при создании ТИС.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта РФФИ № 14-50-00068.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНЕ TPMT У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛИМФОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ НА ТЕРРИТОРИИ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ. ©
А.А. Карнюшка, Р.В. Шайхутдинова. ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет.
miss.anastasia-box@yandex.ru.

Сила токсических реакций при лечении у детей с острым лимфоидным лейкозом (ОЛЛ) зачастую зависит от генетического портрета. Известно, что недостаточность фермента тиопурин-S-метилтрансферазы (TPMT), обусловленная полиморфизмами в гене TPMT, приводит к плохой переносимости лекарственных препаратов тиопуриновой группы (6-меркаптопурина, 6-тиогуанина и азатиоприна). Так, у детей с ОЛЛ при химиотерапии, недостаточность фермента TPMT вызывает гематотоксические осложнения (лейкопению, тромбоцитопению, анемию).

Целью работы явилось выявление полиморфизмов в гене TPMT у детей с ОЛЛ на территории Красноярского края.

В анализ частоты встречаемости полиморфизма в гене TPMT включен 51 ребенок с подтверждённым диагнозом ОЛЛ, получающий лечение по протоколам ALL-BFM и ALL-MB. Средний возраст пациентов составил 10 ± 5 лет (медиана возраста составила 10 лет). Выявление вариантных аллелей TPMT*2 (rs1800462), TPMT*3A (rs1800460) и TPMT*3C

(rs1142345) проводили с использованием набора реагентов «АмплиСенс® Пироскрин» «Фарма – скрин – 2б» (ИнтерЛабСервис).

Из 51 пациента полиморфизмы в гене TPMT обнаружены у 6 детей (11,8%). Из них, 4 пациента имеют вариантные аллели TPMT*3A и TPMT*3C и 2 пациента только TPMT*3C. Кроме того, согласно проведенному нами ранее исследованию по определению хромосомных транслокаций у детей с острым лейкозом на территории Красноярского края [Субботина Т. Н., Карнюшка А. А., Шайхутдинова Р.В. и др. Клиническая лабораторная диагностика. 2016.] у 12 пациентов, включенных в анализ на наличие полиморфизмов гена TPMT, имелись транслокации. Из 12 человек у 3 (25%) были обнаружены вариантные аллели в гене TPMT: у двух пациентов с транслокацией t(12;21) ETV6/RUNX1 и у одного с t(4;11) TCF3/PBX1. В проведенных исследованиях Чуповой Н.В. была описана корреляция между полиморфизмом в гене TPMT и транслокацией t(12;21) ETV6/RUNX1. В проведенном нами исследовании на наличие полиморфизмов в гене TPMT, из 6 пациентов с транслокацией t(12;21) ETV6/RUNX1 у двух были обнаружены вариантные аллели гена TPMT. Прогностическое значение такого случая в литературе не описано.

Полученные данные по распространенности полиморфизмов в гене TPMT соответствуют литературным данным. В дальнейшем нами будет проведена оценка гематотоксических осложнений при применении стандартных доз препаратов тиопуриновой группы на этапах поддерживающей терапии у детей с ОЛЛ на территории Красноярского края.

ВРЕМЕНА ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БЕЛКА КАК ИНФОРМАТИВНЫЙ ПАРАМЕТР ПРИ ДЕНАТУРАЦИИ: ПРИМЕР КАРБОКСИАНГИДРАЗЫ Б. © Н.Е. Карузина,¹ О.О. Лащук,¹ М.А. Герасимова,¹ Б.С. Мельник,² Е.В. Немцева.^{1,3} ¹Сибирский федеральный университет, Красноярск, ²Институт белка РАН, г. Пущино, ³Институт биофизики СО РАН ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, *nkaruzina@sfu-kras.ru*.

Экспериментальное определение последовательности разрушения элементов структуры белковых макромолекул является актуальной проблемой молекулярной биофизики. Считается, что многостадийность денатурации белка можно наблюдать только в кинетических экспериментах, а метод равновесной денатурации не дает информации о промежуточных стадиях разворачивания.

В работе проанализированы стадии денатурации карбоксиангидразы Б по временам жизни триптофановой флуоресценции этого белка. Объектами исследования являлись: карбоксиангидраза Б дикого типа (BCAII) и мутанты L139A и A53C/A76C. Равновесную денатурацию проводили мочевиной (концентрация 0 – 8,5 М). Для регистрации флуоресценции белков при стационарном и импульсном возбуждении использовали спектрофлуориметр Fluorolog 3–22 (Horiba Jobin Yvon, США). Измерения проводили в диапазоне 305–419 нм. Спады флуоресценции описывали как сумму экспоненциальных компонент, определяя таким образом времена жизни флуоресценции белка.

Были получены 3 времени жизни триптофановой флуоресценции для каждого из белков (τ_1 , τ_2 и $\tau_3 < 0,3$ нс). С ростом концентрации мочевины происходило изменение времен жизни в пределах: $\tau_1 = 4,9–5,5$ нс, $\tau_2 = 1–2$ нс. Установлено, что кривые перехода, построенные по τ_1 и τ_2 , отличаются от переходов, регистрируемых по параметрам стационарной флуоресценции (I_{335} , I_{320}/I_{360}). Найденные по временам жизни середины переходов находятся в хорошем соответствии с кинетическими данными, согласно которым разворачивание карбоксиангидразы проходит через образование двух промежуточных состояний. Времена жизни мутанта с дополнительной дисульфидной связью (A53C/A76C) в присутствии 1,4-дителиотрита оказались близки в пределах погрешности к временам жизни флуоресценции карбоксиангидразы дикого типа.

РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫЕ АНТИГЕНЫ — СЕМЕНОГЕЛИНЫ I И II МОДУЛИРУЮТ МЕТАБОЛИЗМ И УСТОЙЧИВОСТЬ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ РАКА ЛЕГКОГО И МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. © А.И. Кизенко, О.Ю. Шувалов, Н.А. Барлев. ФГБУН Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, alyona.kizenko@gmail.com.

Белки семеногелин I (SgI) и семеногелин II (SgII) составляют от 20% до 40% белков семенной жидкости у человека. Эти белки участвуют в транспорте ионов цинка, антибактериальной защите, активации гиалуронидазы и регуляции движения сперматозоидов.

При этом, в литературе накапливается все больше данных о том, что семеногелины могут быть детектированы в клинических образцах злокачественных новообразований различного генезиса, а также в крови онкобольных пациентов. Например, было показано, что эти белки экспрессируются и экскретируются клетками карциномы легкого. При этом какие-либо данные о биологических функциях семеногелинов в раковых опухолях на

сегодняшний день отсутствуют. Кроме того, остаётся неясным, является ли экспрессия семеногелинов в раковых клетках следствием глобального нарушения транскрипционного паттерна, свойственного раковым клеткам, или же раковые клетки, экспрессирующие семеногелины, обладают селективным преимуществом.

Мы провели биоинформатический анализ, который показал высокую корреляцию между уровнем экспрессии семеногелинов и низкой выживаемостью пациентов при ряде злокачественных новообразований, включая рак легкого. С целью прояснения биологической роли семеногелинов в неопластических клетках мы использовали временную трансфекцию клеточных моделей немелкоклеточного рака легкого человека (линии H1299) и карцинома молочной железы (MDA-MB-231) векторами, кодирующими семеногелины I и II. После этого нами были оценены мембранный митохондриальный потенциал, а также устойчивость клеток к окислительному стрессу.

Проведенные нами эксперименты показали, что сверхэкспрессия семеногелинов приводила к значительному повышению мембранного митохондриального потенциала, что свидетельствует о повышении энергетического статуса клеток. Кроме того, гиперэкспрессия семеногелинов способствовало подавлению окислительного стресса, индуцированного обработкой перекисью водорода.

Таким образом, начальные результаты, полученные нами с использованием клеточных моделей неоплазий человека, свидетельствуют о потенциальной биологической роли семеногелинов в регуляции онко-ассоциированного метаболизма и окислительного стресса.

Данная работа поддержана грантом РФФИ No.17-75-10205.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ЯДРЫШКОВЫХ БЕЛКОВ И ТРАНСКРИПЦИЯ В ЯДРЫШКАХ ПОЗДНИХ ВИТЕЛЛОГЕННЫХ ООЦИТОВ *RANA TEMPORARIA*.
Д.Ю. Кирюшина,¹ Н.В. Ильичева,² Г.Н. Почукалина,² О.И. Подгорная.^{1,2,3} ¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ³Дальневосточный федеральный университет, Владивосток.
25kirdash@gmail.com.

В ооцитах многих животных на стадии диплотены профазы I мейоза происходит формирование особой структуры — кариосферы, которая представляет собой результат концентрации всех хромосом клетки в ограниченном объеме ядра. Формирование кариосферы сопровождается значительным снижением транскрипционной активности

ядра. Кариосфера травяной лягушки *Rana temporaria* окружена внешней капсулой, состоящей из волокнистого компонента, в который включены многочисленные белковые тельца, в том числе амплифицированные ядрышки. Цель настоящей работы – определить локализацию некоторых ядрышковых белков в ооцитах *Rana temporaria* на V стадии развития ооцита, а также исследовать транскрипционный статус ядрышек на этой стадии. Методом непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания с помощью специфичных антител определили локализацию четырех ядрышковых белков: UBF, NO38 (B23, нуклеофозмин), Nopp140, фибрилларин. Обнаружено, что белки UBF и NO38 находятся в небольших количествах в ядрышках, а также в волокнистом компоненте капсулы кариосферы. Белок Nopp140, общий для ядрышек и телец Кахаля, присутствует только в тельцах Кахаля. Фибрилларин обнаружен в тельцах Кахаля, а также в гораздо меньших количествах в ядрышках и в волокнистом компоненте капсулы кариосферы. Для идентификации сайтов транскрипции проводили микроинъекции BrUTP в ооциты с последующим иммунофлуоресцентным окрашиванием ядер антителами к BrUTP. Обнаружено, что в ядрышках сохраняется остаточная транскрипция. Таким образом, белковый состав ядрышек поздних вителлогенных ооцитов *Rana temporaria* значительно отличается от состава ядрышек соматических клеток. Изменения в локализации ядрышковых белков могут быть связаны с постепенным угасанием транскрипции рРНК в ооците.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и гранта РФФИ (№ 15-15-20026).

ФОТОКОНВЕРСИЯ СИНЕГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА TagBFP КАК НОВЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ МИКРОСКОПИИ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ.

Н.В. Клементьева,¹ К.А. Лукьянов,^{1,2} Д.А. Горбачев,^{2,3} Е.В. Загайнова,¹ А.С. Мишин.^{1,2}

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород,

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, ³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, nvklementieva@gmail.com.

Для методов флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (ФМСР), основанных на локализации одиночных молекул, требуются флуорофоры, способные к фотоконверсии. Цель настоящей работы состояла в изучении способности синего

флуоресцентного белка TagBFP к фотоконверсии и возможности его использования в субдифракционной микроскопии.

Мы изучили фотоконверсию TagBFP в живых клетках HeLa и NIH/3T3. Было обнаружено, что при воздействии лазером 405 нм низкой мощности в режиме полного внутреннего отражения флуоресценции TagBFP демонстрирует колебания интенсивности флуоресцентного сигнала в миллисекундной шкале, которые могут быть детектированы EM-CCD камерой микроскопа. В результате обработки серий изображений методом SRRF (super-resolution radial fluctuations) были получены субдифракционные изображения цитоскелета живых клеток. Мы также обнаружили, что в условиях, обычно используемых для наблюдения TagBFP, детектируется его частичный переход в красное флуоресцентное состояние. Эффективность такой фотоконверсии недостаточно высока для ФМСП, но может служить источником артефактов при многоцветной микроскопии.

Таким образом, мы впервые показали, что TagBFP может служить инструментом для проведения ФМСП.

Работа выполнена при поддержке Стипендии Президента РФ (СП-4194.2016.4).

ВКЛАД БЕЛКА p53 В РЕСВЕРАТРОЛ-ОПОСРЕДОВАННЫЕ ЭФФЕКТЫ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ. © А.Р. Князева,^{1,2} И.И. Суворова.¹ ¹Институт цитологии РАН, ²Биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, aleksandra.knyaz@mail.ru.

Эмбриональные стволовые клетки являются плюрипотентными и при определенных условиях способны к непрерывному самообновлению *in vivo*. Однако в процессе длительного культивирования ЭСК могут подвергаться спонтанной дифференцировке. В настоящее время продолжается поиск из числа молекул, которые могли бы войти в протокол для культивирования ЭСК и поддерживать клетки на высоком уровне *in vivo*. Одним из перспективных соединений является ресвератрол – природный фитоалексин, который выделяется некоторыми растениями в качестве защитной реакции на поражение бактериями или грибами. Ранее нами было показано, что ресвератрол способен поддерживать недифференцированное состояние ЭСК мыши, что коррелирует с активацией SIRT1-опосредованной аутофагии в этих клетках. SIRT1 деацетилюет множество клеточных мишеней, в том числе белок p53, тем самым негативно регулируя его транскрипционную активность. Было выявлено, что при действии ресвератрола наряду с активацией SIRT1, выявляется значительный уровень активации белка p53 в ЭСК мыши.

В связи с этим мы решили исследовать вклад белка p53 в ресвератрол-опосредованные эффекты в клетках, в частности в активацию сигнальных путей, регулируемых киназой Ulk1. Киназа Ulk1 является своего рода переключателем на пути регуляции анаболических и катаболических процессов. Ингибирование белка Ulk1 киназой mTOR наблюдается в период роста и усиленной пролиферации клетки, когда в ней преобладают процессы синтеза. Напротив, индукция Ulk1 киназой AMPK приводит к повышению уровня катаболических процессов, в частности, к активации аутофагии. Ранее нами было показано, что ресвератрол значительно увеличивает содержание белка Ulk1 уже на 1 день обработки ЭСК мыши, что сопровождается активацией аутофагии в клетках. При ингибировании белка p53 высокоспецифичным агентом пифитрином α (pifithrin α) в ресвератрол-обработанных клетках наблюдается еще большее увеличение уровня белка Ulk1, а при действии только пифитрина α в клетках также детектировалось значительное увеличение уровня белка Ulk1 по сравнению с контролем. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать предположение, что белок p53 ингибирует аутофагию в ЭСК мыши как в норме, так и при действии ресвератрола.

АКТИВНОСТЬ ЭНДОГЕННЫХ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫХ КАНАЛОВ TRPC1 ЗАВИСИТ ОТ БЕЛКОВ ORAI В КЛЕТКАХ НЕК293. © Д.О. Колесников, Л.Н. Глушанкова, А.В. Перевозникова, А.Ю. Скопин, Е.В. Казначеева, А.В. Шалыгин. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, koledmi3@mail.ru.

Ионы кальция необходимы для запуска различных внутриклеточных сигнальных каскадов. Кальций поступает в цитоплазму клетки из внеклеточного пространства или из кальциевого депо — эндоплазматического ретикулума.

Последние десятилетия во многих лабораториях активно изучается система восполнения концентрации кальция в депо. По мере выхода кальция из ретикулума, сенсоры кальция STIM перемещаются к плазматической мембране, где активируют кальциевые каналы. Через них кальций поступает в цитоплазму и депо перезаполняется.

Известно две группы кальциевых каналов, отвечающих на выход кальция из депо: каналы ORAI и TRPC. Взаимодействие между этими каналами изучено недостаточно. В некоторых исследованиях указано, что белки ORAI входят в состав поры каналов TRPC.

Целью работы было выяснить, как взаимодействуют эндогенный депо-управляемый канал TRPC1 и эндогенные каналы ORAI в клетках линии НЕК293. В клетках с помощью оверэкспрессии, нокдауна малыми интерферирующими РНК или

системы CRISPR/CAS9 изменяли уровень экспрессии основных участников депо-управляемого входа: сенсоров кальция STIM и белков ORAI. Используя метод локальной фиксации потенциала, мы сравнивали свойства канала TRPC1 с известными из литературы свойствами каналов ORAI.

Оценивая активность эндогенных каналов TRPC1 в клетках с оверэкспрессией доминантно-негативных мутантов ORAI, нарушающих проводимость эндогенных каналов ORAI, мы обнаружили, что активные каналы ORAI необходимы для поддержания чувствительности эндогенных каналов TRPC1 к содержанию кальция в депо. Тем не менее, каналы TRPC1 включались в ответ на применение депо-независимого способа их активации.

Сравнивая активность эндогенных каналов TRPC1 для растворов бария и кальция с известными из литературы данными о каналах ORAI, мы показали, что вероятность открытого состояния каналов схожа.

Также мы оценивали активность эндогенных каналов TRPC1 в клетках HEK293 с различным уровнем экспрессии сенсоров STIM. Мы показали, что активность каналов TRPC1 регулируется обеими изоформами кальциевых сенсоров STIM. Более того их активация сенсором STIM2 происходит с задержкой, что аналогично каналам ORAI. Однако в отличие от каналов ORAI, селективность эндогенных каналов TRPC1 не зависела от уровня экспрессии сенсоров STIM.

Суммируя все вышесказанное, мы предполагаем, что белки ORAI не входят в пору эндогенных каналов TRPC, однако активация каналов ORAI необходима для поддержания чувствительности к содержанию кальция в депо каналов TRPC1.

Работы была поддержана грантом РФФИ № 16-04-01792.

ДЕТСКИЕ МОЛОЧНЫЕ ЗУБЫ – ДОСТУПНЫЙ ИСТОЧНИК ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. © А.М. Кольцова, В.В. Зенин, В.И. Турилова, Т.К. Яковлева, Г.Г. Полянская. ФГБУН Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, *koltsova.am@mail.ru*.

Мезенхимные стволовые клетки человека (МСКч), в настоящее время широко применяются для решения прикладных и фундаментальных задач в различных биомедицинских исследованиях. По требованиям Международного общества по клеточной терапии, к МСКч относят клетки, обладающие такими характеристиками как адгезивность, активная пролиферация, экспрессия поверхностных маркеров CD105, CD90,

CD73, CD44, HLA-ABC и отсутствие CD34, CD45 и HLA-DR, способность к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях. Таким образом, все фибробластоподобные клетки, выделенные из различных тканей и органов и обладающие вышеперечисленными характеристиками, могут быть отнесены к МСКч. Уникальным источником МСКч, получение клеток из которого не связано с инвазивными процедурами, являются детские молочные зубы, а именно пульпа зуба.

Целью данной работы было получение клеток из пульпы выпавшего естественным путем молочного зуба ребенка и проверка их характеристик с позиции их соответствия статусу МСКч.

Клетки из пульпы молочного зуба выделяли механически, путем выскребания содержимого канала и промывания его средой. Клетки активно пролиферировали, экспрессировали все поверхностные маркеры МСКч и дифференцировались в остеогенном и хондрогенном направлениях. Для них был характерен нормальный кариотип человека 46 XX. При длительном культивировании (до 25 пассажа), уровень пролиферативной активности постепенно снижался, в то время как нарастала активность β -галактозидазы – маркера старения. Экспрессия поверхностных маркеров МСКч в клетках на поздних пассажах оставалась неизменной.

Из приведенных выше данных следует, что полученная линия неиммortalизованных фибробластов человека стабильно на протяжении длительного культивирования обладает рядом свойств, характерных для МСКч и может быть использована для дальнейших биомедицинских исследований.

СКРИНИНГОВАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ПОИСКА ИНГИБИТОРОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ HSF1. © Л.В. Колударова,^{1,2} А.Д. Никотина,² Е.Р. Михайлова,² Е.Ю. Комарова,^{2,1} Р.В. Суезов,² В.Г. Карцев,³ Б.А. Маргулис,² И.В. Гужова.² ¹Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, ²Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, ³Интербиоскрин, Черноголовка, lidiakoludarova@gmail.com.

Опухолевые клетки находятся в состоянии постоянного стресса. Одной из основ системы защиты таких клеток от неблагоприятных воздействий являются белки семейства теплового шока, в частности HSP70. Известно, что количество HSP70 повышено во многих типах раковых клеток, вследствие чего клетки становятся более устойчивыми к воздействию противоопухолевых препаратов. Регулятором синтеза HSP70 является транскрипционный фактор HSF1, ингибирование функциональной активности которого

может привести к ослаблению опухолевых клеток и к облегчению противоопухолевой химиотерапии. Для поиска эффективного ингибитора активности HSF1 было протестировано 1000 соединений из химической библиотеки компании Интербиоскрин. На первом этапе скрининга с помощью люциферазной репортерной системы и метода оценки активности лактатдегидрогеназы в среде был выявлен эффективный и нетоксичный ингибитор функциональной активности HSF1 – CPF-158. Снижение количества HSP70 в клетках линии НСТ116 под действием ингибитора показано с помощью иммуноблоттинга. Однако в ходе дальнейших исследований выяснилось, что соединение CPF-158 нестабильно и способно диссоциировать. На втором этапе был проведен скрининг стабильных структурных аналогов CPF-158, в ходе которого было выявлено CPF-24, как наиболее эффективный ингибитор. В связи с тем, что все белки теплового шока находятся под контролем единого промотора HSE и CPF-24 ингибирует активность HSF1, то мы предположили, что в опухолевых клетках снизится содержание не только HSP70, но и HSP90, HSP40. Данное предположение мы подтвердили с помощью иммуноблоттинга.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЯДЕР ЖСС В РАЗВИТИИ КОСТИСТЫХ РЫБ. © Е. А. Кондакова,¹ В. И. Ефремов,¹ В. А. Назаров¹, В. В. Козин¹, И. В. Неклюдова², В. А. Богданова³.

¹Биологический факультет Санкт-Петербургского Государственного Университета,

²Биологический факультет Московского государственного университета,

³Государственный научно-исследовательский институт озерного и речного рыбного хозяйства им. Л.С. Берга, Санкт-Петербург, 23eak@mail.ru.

Желточный синцитиальный слой (ЖСС) - это провизорное многофункциональное симпластическое образование, характерное для животных с меробластическим типом развития. ЖСС выполняет морфогенетическую, трофическую и иммунную функции. Для ЖСС Teleostei характерны крупные ядра с высокой степенью плоидности. Провизорные системы, имеющие синцитиальную структуру и/или полиплоидные ядра распространены во многих группах Metazoa. Эта работа посвящена характеристике ядер ЖСС *Danio rerio*, *Misgurnus fossilis*, *Gasterosteus aculeatus*, *Cyprinus carpio* и *Coregonus muksun*. Длину ядер ЖСС и диплоидных ядер измеряли на фотографиях парасагиттальных и сагиттальных гистологических срезов гаструл и личинок в РЦ РМиКТ СПбГУ. Для измерений использовали программы Leica LAS Core и Fiji (Schindelin et al., 2012). Ядра ЖСС разнообразны по размеру и форме. На стадиях бластулы и гастролы у *Danio rerio* и

обыкновенного вьюна происходит последовательное увеличение размеров ядер. Можно предположить, что после гастрюляции плоидность ядер ЖСС более не увеличивается. Наименьшая средняя длина ядер ЖСС характерна для *Danio rerio* ($12,02 \pm 0,30 \mu\text{m}$ во время гастрюляции и $12,51 \pm 0,35 \mu\text{m}$ у личинки), наибольшая – для муксуна ($29,8 \pm 1,96 \mu\text{m}$ во время гастрюляции и $22,93 \pm 0,74 \mu\text{m}$ у личинки; различия статистически не значимы). Средняя длина ядер ЖСС личинок карпа, вьюна и колюшки составляют, соответственно, $16,85 \pm 0,49 \mu\text{m}$, $17,02 \pm 0,55 \mu\text{m}$, $15,57 \pm 0,4 \mu\text{m}$. В ходе гастрюляции у данио-рерио и у обыкновенного вьюна число ядер ЖСС неправильной формы возрастает. Однако ядра исследованных представителей Cypriniformes и колюшки не отличаются такой сложной формой, как ядра ЖСС сиговых. Для ЖСС представителей всех изученных нами видов характерны как очень светлые ядра, так и ядра, содержащие большее количество гетерохроматиновых гранул. Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 16-34-00391).

РАЗРАБОТКА БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТОМ ПОЛИЛАКТИДНЫХ СКАФФОЛДОВ И ММСК КОСТНОГО МОЗГА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ. © П.В. Копелев,^{1,2} С.А. Александрова,¹ Ю.А. Нащекина,¹ М.И. Блинова.¹
¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, *paха94@bk.ru*.

Обладая ограниченным потенциалом к самовосстановлению, суставной хрящ человека часто подвергается необратимым повреждениям. В настоящее время наиболее перспективным способом восстановления хряща является использование клеточных технологий. Цель данной работы состояла в разработке тканеинженерного эквивалента хрящевой ткани на основе трехмерных полилактидных скаффолдов с нанесенным хондроитинсульфатом (ХС) и заселенных мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (ММСК) костного мозга.

Были изготовлены трехмерные скаффолды с диаметром пор порядка 250 мкм из поли(L-L)лактида (Sigma, США) с характеристической вязкостью $\eta=4.0$ дл/г. Также были сформированы полилактидные пленки на поверхности покровных стекол. Был разработан способ нанесения ХС (1 г/мл) (Chondroitin 6-sulfate sodium salt from shark cartilage, C4384, Sigma, USA) на полилактидные матрицы. Методом спектрофотометрии проведен анализ связывания ХС с поверхностью матриц. Установлено, что большая часть ХС сохраняется

на модифицированных полилактидных пленках при культивировании клеток в стандартных условиях до 4 суток.

Для тестирования на биосовместимость полученных скаффолдов методами *in vitro* ММСК костного мозга, выделенные из конечностей новорожденного кролика, культивировали в ростовой среде на поверхности образцов 26 сут. Прижизненная световая микроскопия (Nikon Eclipse TS100) клеток на пленках в течение всего срока показала, что клетки не претерпевали морфологических изменений и заполняли всю свободную поверхность. При исследовании роста ММСК на трехмерных полилактидных скаффолдах методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Jeol JSM-35C, Япония) были обнаружены клетки, прикрепленные непосредственно к поверхности полилактидного скаффолда.

Для выявления способности к хондрогенной дифференцировке ММСК культивировали в индуцирующей среде на полилактидных пленках. Оказалось, что в присутствии ХС сфероиды формируются в течение первых суток, в то время как без него – на третьи. При культивировании клеток на поверхности трехмерных скаффолдов методом СЭМ были обнаружены хондрогенные узелки. Исследование характера экспрессии коллагена II типа методом иммунофлуоресценции (LSM 5 Pascal, ФРГ) выявило интенсивное окрашивание межклеточного матрикса в хондрогенных узелках, формирующихся при культивировании ММСК на модифицированных полилактидных пленках.

Предложенная композиция на основе модифицированных хондроитинсульфатом полилактидных скаффолдов и ММСК костного мозга перспективна для дальнейшей разработки в качестве биомедицинского клеточного продукта для восстановления хрящевой ткани.

Исследование выполнено за счет гранта РНФ № 14-50-00068 и при финансовой поддержке ФАНО России.

МЕК/ERK-ПУТЬ КОНТРОЛИРУЕТ АУТОФАГИЮ В СТАРЕЮЩИХ RAS-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ТРАНСФОРМАНТАХ ЧЕРЕЗ РЕГУЛЯЦИЮ АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМ. © Е.Ю. Кочеткова, Г.И. Блинова, В.А. Поспелов, Т.В. Поспелова. Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, lena.linnaea@gmail.com.

Киназа mTOR млекопитающих и аутофагия регулируют многочисленные клеточные процессы, в том числе клеточный ответ на изменение уровня питательных

веществ, ростовых факторов и стресс. Однако механизмы регуляции активности mTOR и аутофагии остаются не полностью ясными. Лизосомы являются динамическими внутриклеточными органеллами, которые вовлечены как в активацию комплекса mTORC1, так и в процесс деградации аутофагических субстратов. Показано, что при голодании и в процессе клеточного старения происходит перинуклеарная кластеризация лизосом. Это является одной из причин того, что аутофагия не способна ликвидировать поврежденные митохондрии в стареющих Ras-трансформантах при подавлении MEK/ERK-пути. Показано, что и mTORC1 и ERK2-киназа вовлечены в регуляцию биогенеза лизосом путем фосфорилирования транскрипционного фактора TFEB, однако роль лизосом в регуляции аутофагии и поддержании жизнеспособности Ras-трансформированных клеток мало изучена. В связи с этим в работе исследована роль ингибирования mTORC1 и MEK/ERK-активности в регуляции процесса аутофагии, биогенеза лизосом и жизнеспособности стареющих Ras-экспрессирующих клеток. mTOR подавляли низкими дозами ингибитора pp242, MEK/ERK-активность подавляли ингибитором PD0325901. Обнаружено, что подавление mTOR через 24 ч индуцирует в старых клетках аутофагию и к 72 ч культивирования приводит к накоплению LAMP1-позитивного сигнала, свидетельствующего о существенном накоплении лизосом. Через 72 ч лизосомы выявляются в крупных цитоплазматических полостях, где они ко-локализуются вместе с поврежденными митохондриями (IF: LAMP1-TOM20), спасая, таким образом, клетки от гибели. В случае ингибирования MEK/ERK изоляция лизосом с митохондриями при действии ингибитора mTOR pp242 не выявляется, а активируется AMPK-регулируемая аутофагия, которая не спасает клетки от апоптоза. Таким образом, активация mTOR-зависимой аутофагии в клетках с ингибированным MEK/ERK не отменяет апоптотическую гибель. Следовательно, активный MEK/ERK-модуль Ras-пути необходим стареющим клеткам для реализации особого способа выживания, связанного с активацией аутофагии и изоляцией поврежденных митохондрий вместе с избыточным количеством лизосом.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-15-00068

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОЦИТОЗА РЕЦЕПТОРА ЭФР И ЭФР-ЗАВИСИМЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА. *В.В. Кошеверова,¹ Р.С. Каменцева,¹ М.В. Харченко,¹ А.В. Салова,¹ Т.Н. Беляева,¹ О.М. Семенов,² М.В. Истомина,³ Д.Н. Баранова,² Е.С. Корнилова.^{1,2,3}*

¹Институт цитологии РАН, ²Биологический факультет Санкт-Петербургского

государственного университета, ³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, *kosheverova_vera@incras.ru*.

Мезенхимные стромальные клетки человека (МСК), в частности, эндометриальные МСК (эМСК), выделенные из десквамированного эндометрия менструальной крови, перспективны для использования в регенеративной медицине. В настоящее время остается малоизученным, каким образом МСК отвечают на различные биологические стимулы (ростовые факторы, гормоны) и какие сигнальные пути при этом активируются. Одним из важнейших ростовых факторов, регулирующих пролиферацию, дифференцировку, миграционную активность клеток различных типов, является эпидермальный фактор роста (ЭФР). В литературе имеются лишь отрывочные сведения о роли ЭФР и его рецептора (РЭФР) в регуляции жизненного цикла эМСК, а также о молекулярно-клеточных механизмах передачи сигнала в этих клетках. Целью настоящего исследования явилось изучение клеточного ответа эМСК на воздействие ЭФР, а также особенностей регуляции эндоцитозного пути РЭФР и активируемых в ходе эндоцитоза РЭФР-зависимых сигнальных путей в этих клетках.

Мы показали, что ЭФР, добавленный на стадии самообновления, стимулирует пролиферацию эМСК человека, т.е. может рассматриваться как митогенный фактор для этих клеток. Также мы обнаружили, что организация РЭФР-опосредуемых сигнальных путей в пролиферирующих эМСК имеет ряд особенностей по сравнению с иммортализованными клеточными линиями. Так, в клетках линии HeLa и COS7 ЭФР-содержащие везикулы сразу после формирования и отделения от плазматической мембраны последовательно взаимодействуют с везикулами, несущими APPL1 (транскрипционный фактор, активирующий гены раннего ответа), а затем с EEA1-везикулами, опосредующими гомотипические слияния эндосом, необходимые для их созревания из ранних в поздние. В эМСК формирующиеся из плазматической мембраны транспортные везикулы, содержащие ЭФР-рецепторные комплексы, сначала взаимодействуют с ранними эндосомами, несущими фактор заякоривания EEA1, а затем и с другой популяцией ранних эндосом, несущих APPL1. В результате в эМСК на поздних сроках эндоцитоза ЭФР-содержащие везикулы выявляются в околоядерной области в составе укрупненных тройных структур, содержавших одновременно EEA1 и APPL1 сигнал.

Мы также проанализировали динамику активации основных РЭФР-зависимых сигнальных путей в эМСК в ответ на добавление ЭФР. Оказалось, что для эМСК характерна длительная активация (в течение 2 часов после добавления лиганда)

компонентов МАР-киназного пути (Erk $\frac{1}{2}$), а также серин-треониновой киназы Akt, тогда как в HeLa активация этих белков является транзиторной. Таким образом, впервые выявлены особенности ЭФР-зависимой сигнализации и эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов в эмСК, что открывает перспективы для дальнейшего изучения роли ЭФР и его рецептора в нормальных клетках, обладающих свойством стволовости.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ В ПРИСУТСТВИИ UM 171 И ЛАМИНИНА 521 В ГИПОКСИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ ЯВЛЯЕТСЯ ОПТИМАЛЬНЫМ ДЛЯ ЭКСПАНСИИ. С.А Кошкин,^{1,2} Н. Чаухан,² Б.В. Мадхукар,² С. Омар.² ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия ²Департамент педиатрии и эмбриологии, Мичиганский государственный университет, Ист-Ленсинг, США, *Koshkin31@mail.ru*.

Гематопоэтические стволовые клетки (ГПСК) пуповинной крови являются потенциальным источником клеток для заместительной терапии. Однако, для получения достаточного количества клеток, необходима их экспансия *in vitro*. С целью моделирования «ниши» ГПСК предлагается культивирование клеток в гипоксических условиях, с добавлением производного пиримидоиндола - UM-171 (антагонист АНР (Арил-гидрокарбонатного рецептора)). Покрытие культуральной поверхности компонентами межклеточного матрикса (Ламинином 521) препятствует дифференцировке клеток, а также способствует их экспансии.

В данном исследовании применен метод анализа данных, полученных в ходе длительной таймлапс-микроскопии. Был проведен поиск оптимальных условий для экспансии гематопоэтических стволовых клеток пуповинной крови.

На момент окончания эксперимента (6 дней наблюдения), максимальное увеличение количества клеток в контрольной группе (без Ламинина, без UM171), не превышает двухкратного (медиана-1,2; $\sigma = 0,37$). Добавление в культуральную среду UM171 приводит к увеличению экспансии (макс- 3,6; медиана -1,1; $\sigma = 1,12$). Дополнительное к воздействию антогониста покрытие поверхности культуральной чашки Ламинином 521, позволяет добиться более чем пятикратной экспансии (макс- 5,4; медиана - 2,7; $\sigma = 1,7$). Данные исследования обработаны в программе «STATISTICA 10.0» с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Таким образом, выращивание ГПСК в среде без сыворотки с добавлением антогонистов диоксинового рецептора (UM-171), в условиях, моделирующих микроокружение (путем покрытия культуральной поверхности Ламинином 251 и созданием гипоксических

условий), позволяет значительно повысить количество стволовых клеток, пригодных для клеточной терапии. Перед клиническим этапом исследования необходимо определить степень безопасности предложенного метода экспансии, а также эффективность дифференцировки полученных клеток.

Работа С.А. Кошкина спонсировалась за счет средств гранта РНФ-14-50-00068

МЕХАНИЗМ ТРАНСПОРТА НУКЛЕОЗИДОВ NR И NAR В КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА. ©

В.А. Куликова,^{1,2} А.В. Кропотов,¹ К.Б. Нериновский,³ А.П. Якимов,^{2,4} Шабалин К.А.,^{1,4} Светлова М.П.,¹ Соловьева Л.В.,¹ А.А. Никифоров.¹ ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, ³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, ⁴Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина. *livinskaya17@mail.ru.*

Никотинамид аденин динуклеотид (NAD) является коферментом дегидрогеназ, катализирующих окислительно-восстановительные реакции центральных метаболических путей в клетках человека. Помимо этого, расщепление NAD является ключевым элементом множества сигнальных процессов. Так, динуклеотид используется для модификаций белков (деацетилирования и АДФ-рибозилирования), а также является предшественником сигнальных молекул. Успешная регуляция данных NAD-зависимых метаболических и сигнальных процессов зависит от того, насколько эффективно клетке удастся поддерживать определенный уровень данного динуклеотида. Основным способом регуляции уровня NAD в клетках человека является его биосинтез из поступающих с пищей витаминов В3: никотинамида (Nam), никотиновой кислоты (NA) и рибозидов никотинамида (NR) и никотиновой кислоты (NAR). Однако, на сегодняшний день механизм импорта нуклеозидов NR и NAR в клетки человека неизвестен. У человека нуклеозиды и основания проникают в клетки посредством переносчиков нуклеозидов, принадлежащих к двум семействам трансмембранных белков - ENT (equilibrative nucleoside transporters) и CNT (concentrative nucleoside transporters).

Целью данной работы была проверка гипотезы о том, что переносчики ENT и CNT могут, помимо уже описанных нуклеозидов, также транспортировать через плазматическую мембрану NR и NAR. Для этого клетки человека линии НЕК 293 выращивали в стандартной питательной среде DMEM, с добавлением нуклеозидов NR или NAR. Далее с помощью ЯМР-спектроскопии мы анализировали изменения

концентрации нуклеозидов NR и NAR в кондиционированной питательной среде после добавления ингибитора переносчиков семейства ENT (S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine, NBTI) и после сверхэкспрессии в клетках белков ENT1-4 или CNT1-3. Мы показали, что ингибитор NBTI эффективно подавляет импорт нуклеозида NR в клетки HEK 293 и HeLa, а также, что концентрация нуклеозидов NR и NAR в среде значительно уменьшается после сверхэкспрессии в клетках HEK 293 белков ENT1-4. Таким образом, мы установили, что транспорт нуклеозидов NR и NAR в клетки человека опосредуют переносчики семейства ENT.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-10240).

ИОНОРЕГУЛИРУЮЩАЯ ФУНКЦИЯ ПОЧЕК ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ТРАНСПОРТА НАТРИЯ В ПРОКСИМАЛЬНОМ КАНАЛЬЦЕ НЕФРОНА. © *А.В. Кутина, Е.В. Балботкина*. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, *kutina_anna@mail.ru*.

Почки являются главным эффекторным органом, обеспечивающим поддержание ионного гомеостаза. Детально изучено участие дистальных отделов нефрона в избирательной реабсорбции отдельных ионов и регуляция этого процесса в зависимости от состояния водно-солевого баланса. В то же время всасывание ионов в проксимальном канальце рассматривается как облигатный процесс, интенсивность которого постоянна. Представляло интерес исследование изменения характера экскреции ионов при угнетении основных транспортных систем для ионов Na в проксимальном канальце (Na/глюко-транспортёр SGLT2, Na/H-обменник). Эксперименты проведены на крысах линии Вистар. Использованы дапаглифлозин (ингибитор SGLT2; 0.1 мг на 100 г м.т.) и эксенатид (миметик глюкагоноподобного пептида-1, угнетающий в почке активность Na/H-обменника; 0.6 мкг на 100 г м.т.), которые вводились животным как при стандартном водно-солевом режиме, так и на фоне нагрузки 0.9% раствором NaCl (5 мл на 100 г м.т.). Показано, что при стандартных условиях угнетение SGLT2 вызывает выраженную глюкозурию (37 ± 5 мкмоль/ч), но не изменяет выведения Na и других ионов (K, Mg, Ca, Cl). На фоне нагрузки 0.9% раствором NaCl под действием дапаглифлозина происходит рост выведения Na и K по сравнению с соответствующим контролем. Угнетение Na/H-обменника вызывает рост диуреза, выведения Na, Cl, Mg, Ca, в меньшей степени K;

экскретируемая фракция Na (EF_{Na}) возрастает до $16 \pm 1\%$. При введении миметика глюкагоноподобного пептида-1 на фоне нагрузочной пробы 0.9% раствором NaCl ускоряется выведение избытка ионов Na из организма, EF_{Na} достигает $18 \pm 1\%$, повышается экскреция Mg, снижается выведение K. Полученные данные указывают на существенный вклад Na/H-обменника в процессы реабсорбции ионов в почке, а также на возможность модуляции ионорегулирующей функции почки за счет изменения интенсивности проксимальной реабсорбции. Работа выполнена в рамках госзадания ИЭФБ РАН (№ госрегистрации АААА-А18-118012290371-3).

ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ЯДЕРНОГО РЕЦЕПТОРА NR4A3 ПРИВОДИТ К ПОДАВЛЕНИЮ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ©
Т.С. Леонова, А.А. Дакс, О.Ю. Шувалов, А.В.Петухов, Н.А. Барлев, О.А.Федорова
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *fedorovaolgand@gmail.com*.

Ядерные рецепторы представляют собой класс белков, которые способны связываться с ДНК и таким образом регулируют экспрессию различных генов в ответ на связывание с лигандами. Ядерные рецепторы обеспечивают прямую связь между сигнальными молекулами и транскрипционным ответом. Лигандами могут быть гормоны, продукты метаболизма, витамины, однако существует большое количество ядерных рецепторов, для которых не идентифицирован природный лиганд и такие рецепторы называют «сиротскими» или орфанными. Среди группы рецепторов, для которых не обнаружен лиганд, выделяют группы орфанных рецепторов NR4A: NR4A1, NR4A2, NR4A3. Ядерные рецепторы NR4A принимают участие в различных клеточных процессах таких как метаболизм, репарация ДНК, апоптоз. При этом участие в данных процессах осуществляется как за счет транскрипционной активности рецепторов NR4A, так и за счет белок-белковых взаимодействий. Поскольку ядерные рецепторы принимают участие в таких важных для жизнедеятельности клеток процессах, то несложно предположить, что нарушения в экспрессии данных белков могут приводить к различным заболеваниям, в том числе и злокачественным новообразованиям. Из литературных данных известно, что при раке молочной железы наблюдается изменение экспрессии NR4A3, однако роль NR4A3 при раке остается малоизученной. Целью данной работы являлось определить влияние NR4A3 на пролиферацию и рост клеток рака молочной железы. Нами были получены клеточные линии рака молочной железы MDA-MB-231 и MCF7 с разным статусом экспрессии NR4A3 (оверэкспрессия и нокдаун). С помощью

теста образования колоний и МТТ-теста было показано, что усиление экспрессии NR4A3 значительно снижает рост клеточных линий. Мы также показали, что NR4A3 усиливает экспрессию про-апоптатических генов таких, как PUMA или Bax как на уровне мРНК помощью ПЦР в реальном времени, так и на уровне белка с помощью вестерн-блот анализа. Чтобы доказать, что усиливается уровень апоптоза в клеточных линиях с высоким уровнем экспрессии NR4A3, мы измерили изменение уровня митохондриального потенциала с помощью коммерческого красителя MitoTracker (Invotrogen), а также оценили высвобождение цитохрома C с помощью иммуноцитохимии. Наши эксперименты показали, что экспрессия NR4A3 приводит к значительному снижению роста клеточных линий рака молочной железы, а также усилению апоптоза. Поскольку на уровень активности NR4A3 можно влиять с помощью низкомолекулярных веществ, то данный рецептор может быть рассмотрен как фармакологическая мишень для лечения рака молочной железы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-34-60228 (мол_а_дк) и РНФ (14-15-00816).

МОДЕЛИРОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ДЛИННОЦЕПОЧНЫХ АЛЬДЕГИДОВ «БЫСТРЫМИ» И «МЕДЛЕННЫМИ» БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ЛЮЦИФЕРАЗАМИ ©

А.Е. Лисица,¹ А.А. Деева,¹ Е.В. Немцева,^{1,2} Н.А. Муруган,³ Х. Агрен,³ В.А. Кратасюк,^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск, ²Институт Биофизики СО РАН, Красноярск, ³Королевский технологический институт, Стокгольм, AlbertFox91@gmail.com.

Бактериальная люцифераза – это флаavin-зависимая монооксигеназа, которая катализирует реакцию формирования электронно-возбужденного интермедиата. Субстратами реакции являются восстановленный флавиномононуклеотид, получаемый в реакции, катализируемой оксидоредуктазой, и длинноцепочечный альдегид, формируемый мультиферментным комплексом восстановления жирных кислот. Бактериальные люциферазы из разных светящихся видов имеют различные структурные свойства и характерную кинетику реакции: ферменты из видов *Photobacterium* и *Aliivibrio* обычно называют «быстрыми» люциферазами, тогда как ферменты из видов *Vibrio* и *Photorhabdus* – «медленными». Известно, что мультиферментные комплексы восстановления жирных кислот из бактерий с «быстрыми» люциферазами специфичны к тетрадеканалу, в то время как комплексы из других светящихся видов – к деканалу.

Структурный аспект взаимодействия между люциферазами бактерий и альдегидами с различной длиной цепи по-прежнему остается неясным.

В настоящей работе для выяснения режима связывания деканала, додеканала и тетрадеканала в активном центре бактериальных люцифераз был выполнен молекулярный докинг с использованием Autodock Vina. Были изучены ферменты двух видов бактерий: *V. harveyi* (PDB ID: 3FGC) и *P. leiognathi*. Третичная структура люциферазы *P. leiognathi* была получена с использованием сервера Swiss-MODEL при помощи метода гомологического моделирования со структурой люциферазы *V. harveyi* в качестве матрицы. Моделирование молекулярной динамики для обеих структур проводили в GROMACS (силовое поле CHARMM36) в течение 20 нс при 298 К и постоянном давлении 1 атм. Затем β -субъединица люциферазы была удалена, а для α -субъединицы был проведен жесткий молекулярный докинг с флавин-4а-гидропероксидом. Полученный комплекс использовали для дальнейшего докинга альдегидов.

По результатам докинга была установлена структура центров связывания длинноцепочечного альдегида для двух типов люцифераз. Обнаружено, что люцифераза *P. leiognathi* связывает тетрадеканаль с более высокой аффинностью чем деканаль, в то время как для люциферазы *V. harveyi* наблюдается обратная зависимость. Кроме того, установлено, что обе люциферазы фиксируют в активном центре флавин-4а-гидропероксид сходным образом, не смотря на различия в строении активного центра.

Исследование было поддержано Российским научным фондом (№16-14-10115) и Краевым государственным автономным учреждением «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности».

КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ, СОЛЮБИЛИЗИРОВАННЫЕ L-ЦИСТЕИНОМ:
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С КЛЕТКАМИ. © И.К. Литвинов,^{1,2} Т.Н. Беляева,¹ А.С. Баженова,²
Е.А. Леонтьева,¹ А.О. Орлова,² Е.С. Корнилова.^{1,2,3,4} ¹Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Университет ИТМО, Санкт-Петербург, ³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, ⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, lik314@mail.ru.

Благодаря своим уникальным фотофизическим свойствам квантовые точки (КТ) находят широкое применение в биологии и биомедицинской диагностике. В этом случае, коллоидные нанокристаллы, синтезированные в органических растворителях, переводят в водную среду путем солюбилизации, при которой происходит замена молекул

стабилизатора на молекулы солюбилизатора, и формирование новой оболочки. Такая оболочка обеспечивает водорастворимость и повышает стабильность при различном внешнем окружении. Кроме того, при создании комплексов, к оболочке нанокристаллов могут присоединяться различные антитела, пептиды и малые молекулы, обеспечивающие таргетную доставку КТ в клетки. В качестве перспективного солюбилизатора можно использовать L-цистеин. Данное соединение способно связываться с поверхностью КТ, благодаря тиольной группе, а наличие карбоксильной и аминогруппы позволяет создавать многокомпонентные зондовые системы.

КТ на основе CdSe/ZnS диаметром 6 нм, с максимумом люминесценции при 570 нм, были синтезированы на базе университета ИТМО. Исходно гидрофобные КТ были солюбилизированы с помощью покрытия их поверхности L-цистеином методом межфазного переноса. Анализ фотофизических характеристик таких нанокристаллов методами стационарной оптической спектроскопии показал фотостабильность КТ и их устойчивость к агрегации. Исследовалось взаимодействие КТ (в концентрации 50 нМ) с клетками линии HeLa. С помощью конфокальной микроскопии показано, что после 24 часов инкубации с клетками, значительная часть КТ формирует большие агрегаты, в основном локализующиеся на поверхностной мембране клеток и остающиеся там даже после многоразовой отмывки раствором PBS и PBS/BSA. Тем не менее, часть КТ обнаруживается внутри клеток в составе везикул, что подтверждается анализом изображений, полученных при прижизненном сканировании клеток по оси Z, окрашенных Hoechst 33342. Идентификация КТ-содержащих компартментов была произведена путем анализа колокализации с маркерами основных компартментов эндоцитозного пути (LysoTracker, Rab5, EEA1, Lamp1). Обнаружено, что через 24 ч инкубации КТ выявляются в лизосомах. Наши результаты свидетельствуют, что КТ, солюбилизированные L-цистеином, демонстрируют существенный уровень неспецифического взаимодействия с клетками. Это обстоятельство должно учитываться при использовании таких КТ в качестве основы для создания многокомпонентных зондовых наноструктур.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (18-34-00382).

НЕЙРОМОДУЛЯТОР ЧЕЛОВЕКА LYNX1 РЕГУЛИРУЕТ СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ И КОРРЕКТИРУЕТ УХУДШЕНИЕ КОГНИТИВНОЙ ФУНКЦИИ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ. © Е.Н. Люкманова.^{1,2} МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва,

²Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, *ekaterina-lyukmanova@yandex.ru*.

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) являются лигандозависимыми ионными каналами, дисфункция которых приводит к когнитивным нарушениям, наблюдаемым при многих нейродегенеративных заболеваниях. Мембраносвязанный белок Lynx1 модулирует работу nAChR в областях мозга человека, важных для памяти и обучения. Ранее нами было показано, что водорастворимый вариант нейромодулятора человека Lynx1 (ws-Lynx1), конкурирует с β -амилоидным пептидом $A\beta_{1-42}$ за связывание с $\alpha 7$ -nAChR и снижает цитотоксический эффект $A\beta_{1-42}$ на культуре кортикальных нейронов.

В данной работе мы изучали роль Lynx1 в когнитивных процессах. Мы изучили эффекты ws-Lynx1 на мышах дикого типа (C57BL/6) и трансгенных животных, моделирующих болезнь Альцгеймера (2xTg-AD). Мы показали, что ws-Lynx1 проникает через гематоэнцефалический барьер при интраназальном введении и накапливается в коре головного мозга, гиппокампе и мозжечке. Двухнедельное введение ws-Lynx1 значительно снижало тревожность и предотвращало нарушение памяти у мышей дикого типа и 2xTg-AD. У мышей, принимающих ws-Lynx1, также наблюдалась положительная модуляция синаптической пластичности, связанная с активацией пресинаптических $\alpha 7$ -nAChR и увеличением вероятности выброса глутамата. Ws-Lynx1 повышал уровень мРНК эндогенного *Lynx1* и нормализовал повышенный уровень ацетилхолинэстеразы в коре головного мозга 2xTg-AD мышей. Таким образом, Lynx1 можно рассматривать как природный «защитник» холинергической системы мозга, а его растворимый аналог как потенциальный препарат для коррекции когнитивных нарушений, характерных для нейродегенеративных заболеваний.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№16-14-00102).

С-КОНЦЕВОЙ УЧАСТОК БЕЛКА P131 ИНГИБИРУЕТ ХИМОТРИПСИН-ПОДОБНУЮ АКТИВНОСТЬ 26S И 20S ПРОТЕАСОМ *IN VITRO*. © Е.А. Малкина,^{1,2} Е.Е. Дьяконов,^{2,3} А.Н. Томилин^{2,3} А.С. Цимоха.² ¹Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, ²Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, ³Санкт-Петербургский Государственный Университет, *elizawetavolck@gmail.com*.

Протеасома – мультисубъединичный белковый комплекс, отвечающий за протеолиз белков в клетке. Протеасомы обнаружены как в клетке, так и во внеклеточном

пространстве. Функции внеклеточных протеасом пока не известны. Белок PI31 молекулярной массой 29.7 кДа (217 а.к.) ингибирует гидролиз небольших синтетических субстратов и крупных развернутых белков 20S протеасомой. Поскольку популяция протеасом в среде представлена 20S комплексами, то мы рассматриваем белок PI31 в качестве кандидата на роль специфического для внеклеточных протеасом ингибитора.

Показано, за ингибирующую активность белка PI31 отвечает С-концевой участок длиной 123 а.к. На основе этого участка мы создали рекомбинантный белок мыши mсPI31, слитый на С-конце с последовательностью из шести гистидинов для дальнейшей аффинной очистки. Последовательность рекомбинантного белка была заклонирована в вектор рЕТ-24 d (+) для дальнейшей экспрессии в бактериях *E. coli* и последующей очистки с помощью хелатного Ni^{2+} носителя. Анализ эффективности ингибирования протеасом в присутствии mсPI31 *in vitro* провели с помощью реакции гидролиза специфического для химотрипсин-подобной активности флуорогенного пептида. 26S и 20S протеасомы для этой реакции были аффинно очищены из клеток человека линии K562. В качестве положительного контроля в реакции мы использовали 1 мкМ специфического для протеасом ингибитора MG132. Экспериментально показано, что ингибирующая активность mсPI31 по отношению к 26S протеасоме проявляется уже при концентрации 0.5 мкМ и при концентрации 1 мкМ эффективность ингибирования становится сравнима с ингибитором MG132. Аналогичные результаты мы получили по отношению к 20S протеасоме, в том числе после ее активации в присутствии 0.01% SDS.

В результате работы мы показали, что С-концевой участок белка PI31 ингибирует химотрипсин-подобную активность 26S и 20S протеасом *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ 16-14-10343.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОРАКОВЫХ ХИМИОПРЕПАРАТОВ НА КЛЕТКИ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА С РАЗЛИЧНЫМ СТАТУСОМ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ SET7/9. © В. Мамонтова, А. Дакс, А. Петухов, О. Шувалов, О. Федорова, П. Старшова, Н. Барлев. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Цитологии Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, victoria.shubina@icloud.com.

Рак легкого является одним из самых часто встречающихся типов опухолей, а также это наиболее распространенная причина онкологической смертности. Одной из наиболее часто встречающихся мутаций при раке легкого является мутация гена KRAS (наиболее

часто встречаются миссенс-мутации аминокислот G12, G13 и Q61). Наличие мутаций в гене KRAS часто ассоциировано со сниженной выживаемостью у пациентов с немелкоклеточным карциномой легкого (НМККЛ). Также, существуют данные о корреляции между мутантным KRAS и повышенной экспрессией метилтрансферазы Set7/9.

На сегодняшний день показано, что гистон-специфичная метилтрансфераза Set7/9 метилирует не только гистоны, но и транскрипционные факторы (например, p53, E2F1, YAP), регулирующие такие клеточные процессы как пролиферация, апоптоз и ответ на стрессовые стимулы. Таким образом, Set7/9 является потенциальным регулятором данных процессов.

В исследовании была использована линия A549 с высоким уровнем экспрессии эндогенного белка Set7/9 и мутацией KRAS G12S. С помощью системы CRISPR-Cas9 была получена линия клеток с нокаутом Set7/9. В качестве контроля использовали клетки, экспрессирующие Cas9 без gRNA.

Используя полученную нами клеточную модель, мы показали, что уровень экспрессии Set7/9 влияет на активность факторов репарации, апоптоза и регуляцию клеточного цикла в клетках НМККЛ A549, обработанных цитостатическими препаратами различного механизма действия – доксорубицином, цисплатином и метатрексатом. На основании полученных данных мы предполагаем, что Set7/9 является фактором, определяющим устойчивость клеток рака легкого к ДНК-повреждающим химиотерапевтическим препаратам – доксорубицину и цисплатину.

В ходе дальнейшей работы с помощью системы CRISPR-Cas9 мы планируем получить линии НМККЛ с индуцибельной экспрессией данного гена и исследовать на данных моделях влияние Set7/9 на репарацию, апоптоз и регуляцию клеточного цикла. Для данных целей будут выбраны линии с низким эндогенным уровнем экспрессии Set7/9.

Данная работа обеспечивает возможность рассматривать Set7/9 как биомаркер при выборе оптимальной стратегии лечения карциномы легкого, а также как потенциальную мишень для разработки противоопухолевой химиотерапии.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-75-10198.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КАК МАТРИЦЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛИМБАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ЛЕЧЕНИИ СИНДРОМА ЛИМБАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ. © Т.В. Машель,^{1,3} Д.А. Переплетчикова,^{1,3} К.Э. Журенков,^{2,3} И.О. Гаврилюк,⁴ Г.А. Писугина,^{2,3}

Ю.И. Хорольская,³ О.И. Александрова,³ М.И. Блинова.³ ¹ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, ²ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, ³ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ⁴ФГБОУ ВО ВМА им. С.М.Кирова МО, Санкт-Петербург, *t.mashel@ya.ru*.

Лимбальные стволовые клетки (ЛСК) – клетки, отвечающие за обновление и восстановление эпителия роговицы. При дисфункции или недостаточности ЛСК развивается «синдром лимбальной недостаточности» (СЛН), представляющий собой различные патологические процессы (дистрофия, фиброз, воспалительные изменения и т.д.), приводящие к потере зрения. Одним из вариантов лечения является трансплантация амниотической мембраны (АМ) с культивируемыми ЛСК. К настоящему моменту известно более 10 методов консервации амниона, однако ни один из них не является оптимальным, вследствие чего наблюдается низкий клинический успех.

Целью данной работы являлось выявление в условиях *in vitro* оптимальных способов хранения и обработки АМ, применяемой в качестве матрицы для культивирования клеток при создании скаффолдов. Использовали 3 различных варианта условий хранения и обработки АМ: нативная (гипотермическое хранение в растворах антибиотиков при +4° С), криоконсервированная при -20 ° С и криоконсервированная при -80° С. В качестве клеточных тест-систем использовали ЛСК кролика и человека. Жизнеспособность клеток оценивали по их морфологии и функциональной активности.

В ходе скринингового исследования было выявлено, что методы хранения и обработки АМ влияют на жизнеспособность клеток. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение закономерностей и механизмов влияния методов консервации АМ на её свойства в целях создания тканеинженерных конструкций для лечения синдрома лимбальной недостаточности.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ 14-50-00068.

ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛЮМИНИСЦЕНТНОГО МЕТОДА ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ВОЗДУХА. © А.А. Мельникова, И.К. Довнарovich, Н.В. Римацкая, В.А. Кратасюк. ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Красноярск, *anastasiafb15@gmail.com*.

В Красноярске источники загрязнения атмосферы многообразны, а состав выбросов отличается многокомпонентностью. За прошедший год в г. Красноярске 7 раз был введен режим "черного неба". В связи с актуальной проблемой загрязнения атмосферного воздуха необходим интегральный качественный метод оценки состояния воздушной среды. На сегодняшний день разработан интегральный метод оценки состояния воды на основе биolumинесцентной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза. Целью нашей работы было оценить возможность применения биolumинесцентного метода для определения состояния воздушной среды. Пробоподготовка воздушной среды для биотестирования проводилась с помощью аспиратора АПМ-4-128-40 с использованием двух поглотителей: спирта и дистиллированной воды. Отбор осуществлялся в течение 15–25 минут со скоростью 10–20 л/мин. Было отобрано 14 проб воздуха из разных районов города Красноярска. Анализ проб проводился с помощью ферментативных систем: биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза в растворимой и иммобилизованной форме (реагент «Энзимолум»). Оценку загрязнения проводили на биolumинометре («Promega GloMax» 20/20 Luminometer, USA), регистрируя значения максимальной интенсивности свечения в контрольном I_k и исследуемом образце I_0 . В качестве контроля использовали поглотители воду и спирт. В результате исследования, была оценена степень загрязнения различных проб воздуха с помощью значения остаточного свечения, которое считается по формуле $T(\%) = I_0/I_k \cdot 100\%$. Результаты были сравнены с результатами химических методов, опубликованных на сайте центра метрологии (ЦМС ГУ "Красноярский ЦГМС-Р") в даты отбора проб и в соответствии с пунктами отбора. Сравнительный анализ показал необходимость использования биolumинесцентного метода для комплексного анализа. В результате исследований были выбраны условия пробоподготовки и проведения анализа для наибольшей чувствительности биферментных биolumинесцентных систем к загрязнениям воздуха.

ЭКСПРЕССИЯ D1- И D2-РЕЦЕПТОРОВ ДОФАМИНА В ОРЕКСИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ ГИПОТАЛАМУСА. © И.Ю. Морина. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Санкт-Петербург.

Орексинергические нейроны локализуются в перифорникальной области и посылают свои проекции в различные регионы мозга, в частности, в средний мозг, где оказывают активирующее влияние на дофаминергические нейроны. Однако, вопрос об

участии дофамина в регуляции орексинергических нейронов мало изучен. Цель настоящего исследования - определить возможность и пути влияния дофамина на орексинергические нейроны.

Мозг крысы Вистар фиксировали 4 % параформальдегидом посредством транскардиальной перфузии. Фронтальные свободноплавающие срезы мозга (20мкм) из области гипоталамуса инкубировали в смеси первичных антител: 1) кролика к орексину-А (Sigma, США, 1:1000) и мыши к D1 рецепторам дофамина (D1R, Millipore, США, 1:100); 2) мыши к D1R и кролика к D2 рецепторам дофамина (D2R, Millipore, США, 1:200) 48 ч при 4°C. Для флуоресцентного иммуномечения использовали вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромами: овцы против мыши (Alexa-568) и цыпленка против кролика (Alexa-488). Также срезы обрабатывали ядерным красителем DAPI. Анализ срезов проводили с помощью конфокального микроскопа DMI6000 и лазерной установки SP5 II (Leica Microsystems, Германия).

Таким образом, в перифорникальной области гипоталамуса, где расположены орексинергические нейроны, экспрессия D1R выявлена как непосредственно на орексинергических нейронах, так и в нейронах неизвестной эргичности. Двойное иммуномечение свидетельствует об обильной экспрессии D2R в перифорникальной области, а также о высокой степени колокализации этих рецепторов. Полученные результаты свидетельствует о наличии биохимической основы как для прямого, так и опосредованного действия дофамина на орексинергические нейроны.

КАФФЕИКОВАЯ КИСЛОТА ПОДАВЛЯЕТ Ca^{2+} -ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ХЛОРПРОМАЗИНОМ В МАКРОФАГАХ. © А.А. Наумова, Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, С.Н. Бутов, Н.И. Крутецкая. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, a.a.naumova@spbu.ru.

Хлорпромазин (ХП, аминазин) является типичным нейролептиком первого поколения и широко применяется в лечении шизофрении. Будучи положительно заряженным амфифильным соединением, ХП хорошо проникает через мембраны и может модулировать внутриклеточные процессы, такие как передача сигналов и внутриклеточный транспорт. Ранее нами было впервые показано, что ХП вызывает дозозависимое увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, связанное с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо и последующим депо-зависимым входом Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крыс. Кроме того, нами обнаружено, что во

влиянии ХП на $[Ca^{2+}]_i$ участвует фосфолипаза A_2 – ключевой фермент каскада метаболизма арахидоновой кислоты (АК).

Известно, что в активации и функционировании макрофагов важную роль играют 5-липоксигеназы, которые окисляют АК с образованием лейкотриенов – медиаторов воспалительных и аллергических процессов. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать участие 5-липоксигеназного пути метаболизма АК во влиянии ХП на $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крыс. В экспериментах использовали селективный ингибитор 5-липоксигеназ каффеиковую кислоту.

С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2АМ впервые обнаружено, что преинкубация клеток с каффеиковой кислотой (10 мкМ) в течение 5 мин до введения ХП приводит к существенному подавлению Ca^{2+} -ответов, вызываемых ХП в макрофагах (на $40.0 \pm 7.3 \%$, $n=7$). При введении 20 мкМ каффеиковой кислоты во время фазы плато Ca^{2+} -ответов также наблюдается значительное уменьшение $[Ca^{2+}]_i$ (на $78.2 \pm 6.9 \%$, $n=8$).

Таким образом, нами впервые показано, что ингибитор 5-липоксигеназ каффеиковая кислота подавляет Ca^{2+} -ответы, вызываемые нейролептиком ХП в перитонеальных макрофагах крыс. Полученные результаты свидетельствуют об участии 5-липоксигеназ и/или продуктов 5-липоксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты во влиянии ХП на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах.

РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ МОДИФИКАЦИИ ПОЛИЛАКТИДНЫХ МАТРИЦ АРГИНИНОМ. © Ю.А. Нащекина,¹ А.С. Чабина.² ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ), Санкт-Петербург, *chabina-alina@yandex.ru*.

Биодеградируемые полимеры широко используются как в медицине, так и в тканевой инженерии из-за их хороших физических и биологических свойств. Одним из таких полимеров является поликапролактон (ПКЛ), который используется в качестве шовного материала и как саморассасывающийся термальный имплантат пролонгированного действия (филлер). Однако биологическая совместимость для ПКЛ не до конца удовлетворяет требованиям для имплантации в организм. Целью настоящей работы было увеличение биосовместимости ПКЛ за счёт модификации его природной аминокислотой аргинином.

В качестве объектов исследования были выбраны плёнки, полученные методом полива из раствора ПКЛ в хлороформе. Плёнки обрабатывали в 0,5 М, 0,25 М, 0,1 М

водном растворе аргинина и в 0,25 М, 0,1 М водно-спиртовом растворе аргинина (соотношение воды к изопропиловому спирту (ИПС) 3:1), в течение 10, 30 и 60 минут при $T = 40^{\circ}\text{C}$ и при комнатной температуре в течении суток. Количество аргинина оценивали с помощью нингидриновой реакции. Было выявлено, что при увеличении концентрации аргинина в растворе увеличивается количество связанного аргинина как при $T = 40^{\circ}\text{C}$, так и при комнатной температуре. При нагревании с увеличением времени обработки аргинина увеличивается количество аминокрупп на поверхности пленок: для 0,5 М водного раствора при обработке в течение 30 мин количество аминокрупп увеличилось на 16 %, а после 60 мин обработки – на 63 %, по сравнению с образцами, обработанными в течение 10 мин; для малых концентраций аргинина в растворе изменения не значительны и составляют разницу в 1 – 2%. Обработка плёнок 0,25 М водным раствором аргинина увеличивает адгезию к ним мезенхимных клеток костного мозга кролика по сравнению с необработанными плёнками.

Работа выполнена на средства гранта РФФИ №14-50-00068.

АНАЛИЗ РЕДКИХ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ BRCA1 И BRCA2 У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЯИЧНИКА. © *В.И. Ну.* ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург *asioflammeus203@gmail.com*.

BRCA1/2-ассоциированный наследственный рак молочной железы (РМЖ) и яичника (РЯ) составляет 10-20% от общего числа опухолей данных локализаций. В странах с ярко выраженным «эффектом основателя» (founder-эффектом) рутинная диагностика повреждений BRCA1/2 сводится к анализу наиболее частых (мажорных) мутаций. Исследования последних лет свидетельствуют, что BRCA1/2-индуцированные опухоли характеризуются отличным от «обычных» карцином спектром химиочувствительности и требуют особого подхода к лечению. В этой связи усовершенствование молекулярно-генетической диагностики наследственных форм представляется актуальной задачей.

Целью данной работы являлось определение частоты редких и уникальных мутаций BRCA1/2 у больных РМЖ и РЯ, негативных в отношении частых мутаций в этих генах.

Для исследования было отобрано 387 пациенток с признаками наследственного РМЖ (n=78), РЯ (n=293) и сочетанием указанных патологий (n=16). Все пациенты ранее проходили стандартное тестирование частых мутаций BRCA1 (5382insC, 4153delA, 185delAG) и BRCA2 (6174delT) и не имели указанных аллелей. У всех больных мы выполнили анализ полной кодирующей последовательности генов BRCA1 и BRCA2 с помощью сочетания методов высокоточного анализа плавления ПЦР-продуктов (HRM) и секвенирования.

В результате было обнаружено 65 (17%) различных мутаций с доказанной патогенностью. Частота редких мутаций в группе больных РМЖ составила 19/78 (24%), в группе РЯ – 46/293 (16%), а при сочетании РМЖ/РЯ – 10/16 (63%). В спектре выявленных мутаций повторяющимися аллелями были BRCA1 R1699W, R1751X, G1706E.

Таким образом, высокая частота редких/уникальных повреждений генов BRCA1 и BRCA2 у больных РМЖ/РЯ с признаками наследственного рака свидетельствует о целесообразности проведения исчерпывающего тестирования этой категории пациентов, особенно при сочетании РМЖ и РЯ.

МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ЭНДОГЕННОГО α -АКТИНИНА 4 С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR-Cas9 В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ H1299. © К. С. Новицкая,¹ Е. В. Ломерт,² Д. Г. Тентлер.² ¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, asianov@mail.ru.

Раковые клетки секретируют ряд белков – биомаркеров, участвующих в процессах метастазирования. Так, цитоплазматический α -актинин 4 задействован в динамической ремодуляции актинового цитоскелета, пролиферации и миграции клеток. Моделируя экспрессию α -актина 4, мы сможем исследовать его влияние на биологические процессы в раковых клетках.

Клеточную линию с нокаутом ACTN4 мы получали путем сдвига рамки считывания в результате CRISPR-Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации. Для этого мы трансфецировали культуру клеток немелкоклеточного рака легкого H1299 плазмидой lentiCRISPRv2, содержащей ген белка Cas9, осуществляющего двуцепочечный разрыв ДНК, и клонированный нами дуплекс олигонуклеотидов (gRNA) – “донор” гомологичного участка в области разрыва, направляющий Cas9 к целевой последовательности в гене α -актина 4. Последовательность gRNA мы подбирали таким образом, чтобы сдвиг рамки считывания, нарушающий нормальный синтез белка,

произошел как можно ближе к началу ORF гена актинина (позиция +157 от старта транскрипции). Вестерн-блот анализ тотальных белковых лизатов показал, что в некоторых пробах произошел частичный нокаут («выключена» одна аллель) ACTN4.

Для изучения эффектов сверхэкспрессии ACTN4 мы выбрали индуцибельную Tet-On систему, в которой dCas9 сшит с VP64 доменом, активирующим транскрипцию. Такая система позволяет при добавлении доксициклина на время активировать гены α -актинина 4 (conditional knock-in). Путем трансдукции мы получили стабильную линию с экспрессией dCas9. ПЦР-анализ геномной ДНК показал высокую эффективность трансдукции: dCas9 был во всех пробах.

Для дальнейшего изучения эффектов инактивации ACTN4 мы планируем провести “второй раунд” нокаута. Далее на всех полученных линиях необходимо будет сделать тесты на миграцию, пролиферацию и клеточный цикл раковых клеток, изучить их морфологию.

ВЛИЯНИЕ ДИМЕТИЛГЛИЦЕРОЛАТА КРЕМНИЯ И ГЛИЦЕРИНА НА ЭКСПАНСИЮ КУМУЛЮСНЫХ КЛЕТОК ООЦИТОВ *SUS SCROFA DOMESTICUS*. © Д.А. Новичкова, Т.И. Кузьмина. ВНИИГРЖ– филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Санкт-Петербург, live8avis@mail.ru.

Применение инновационных клеточных репродуктивных технологий имеет важное значение для интенсификации свиноводства. Получение качественных, способных к оплодотворению *in vitro* ооцитов зависит от условий экстракорпорального созревания и прежде всего, от состава сред для культивирования. Для создания таких условий используют различные биологически активные вещества. В настоящем исследовании идентифицированы эффекты диметилглицеролата кремния (ДМГК) и глицерина на функциональное состояние кумулюса (степень экспансии) ооцитов свиней при созревании *in vitro* (44 часа культивирования). В выборе воздействующих веществ исходили из перспектив использования ДМГК в технологии экстракорпорального созревания ооцитов, как 3D системы, за счет структуры гидрогеля, состоящей из кремнийорганических производных полиолов, гелеобразующей добавки (глицерина) и воды; а глицерина, как реагента, используемого в криопротекторных средах для витрификации ооцитов. Ооцит-кумуляные комплексы (ОКК) получали из фолликулов (Ø 3–6 мм) яичников половозрелых свиней и культивировали в среде Sage Media Cleavage с 5% белка Serum Protein Substitut (CooperSurgical, США) и 10 М.Е. хорионического гонадотропина

человека (Sigma, США) (контроль) при температуре 38,5°C в атмосфере 5% CO₂; в опытные группы добавляли 0,2% глицерина (опыт 1) или 0,2% ДМГК (опыт 2). После культивирования кумулюс 497 ОКК оценивали в соответствии с морфологией по показателю – степень экспансии (низкая, средняя, высокая). Не обнаружено достоверных различий в уровне ооцитов на стадии метафазы II между ооцитами опытной и контрольной групп. Доля ооцитов с высокой степенью экспансии КК в опытных группах [опыт 1 – 30% (47/159), опыт 2 – 26% (45/177)] значительно превысил таковую в контроле 18% (29/161) ($P < 0,05$, критерий χ -квадрат). С учетом того, что экспансия КК является одним из косвенных показателей успешного созревания ооцитов, можно прогнозировать, что введение в среду дозревания ДМГК и глицерина положительно скажется на созревании самого ооцита.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В СФЕРОИДАХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ СИНДРОМА АШЕРМАНА. © Ю.В.Обидина, А.П.Домнина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, aldomnina@mail.ru.

Одной из главных причин женского бесплодия является нарушение функции эндометрия в результате его повреждения при внутриматочных вмешательствах с последующим образованием сращений в полости матки. Это приводит к гипо- или аменореи, бесплодию и не вынашиванию беременности. Данная патология называется синдромом Ашермана. Поскольку для многих больных существующие методы лечения этого заболевания неэффективны, так как не приводят к последующей регенерации эндометрия и восстановлению его функций, разрабатываются новые методы лечения с помощью трансплантации стволовых клеток. Культивируемые мезенхимные стволовые клетки человека (МСК) были одобрены для клинических испытаний лечения многих заболеваний из-за их легкой изоляции от доноров, простоты культивирования, потенциала для аллогенных трансплантаций благодаря отсутствию иммунной реакции. Однако при применении методов клеточной терапии, трансплантируемые клетки как правило переносятся в поврежденную ткань и часто становятся мало жизнеспособными, поскольку оказываются в стрессорных условиях. Для повышения выживаемости и пластичности трансплантируемых клеток разрабатываются различные методы предварительной обработки клеток. Одним из вариантов предобработки является культивирование клеток в сфероидах. Нами проводилось культивирование в сфероидах МСК выделенных из менструальной крови человека (эМСК). В результате было установлено, что при

культивировании в сфероиды у ЭМСК сохраняются все исходные свойства (экспрессия соответствующих поверхностных маркеров, способность к дифференцировке в остеобласты, адипоциты, пролиферативная активность) и повышается уровень экспрессии противовоспалительных генов (TSG-6, HGF, EP2). На модели синдрома Ашермана у крыс нами был апробирован способ трансплантации ЭМСК в виде сфероидов. Было обнаружено, что по частоте наступления беременностей и количеству потомства терапевтический эффект трансплантации ЭМСК в виде сфероидов превосходит терапевтический эффект трансплантации ЭМСК в виде суспензии. Таким образом, трансплантация ЭМСК в виде сфероидов может стать перспективным подходом для клеточной терапии бесплодия, вызванного повреждением эндометрия.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ВКЛЮЧЕНИЙ, ФОРМИРУЕМЫХ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНОМ *IN VIVO*. © Ю.Э. Озерова, Е.В. Михайлова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *lextran8@gmail.com*.

Значительное количество экспериментальных данных свидетельствует о том, что амилоидные образования, в частности, наблюдаемые в мозге при нейродегенеративных заболеваниях, характеризуются структурной вариабельностью. В настоящей работе изучали влияние соединения с противоамилоидной активностью, полимера аминокимидазолриботида, на структуру амилоидных агрегатов альфа-синуклеина человека (меченных GFP) *in vivo*, в клетках *S. cerevisiae*.

Мы анализировали агрегаты, сформированные в клетках при культивировании в течение 8 ч и 16 ч в среде, содержащей полимер аминокимидазолриботида и без него, методом FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). GFP выжигали лазером (Leica TCS SP5, об. HCXPLAPO 40×/1.25-0.75, возб. 488 нм) в пределах интересующей области (ROI) внутри включения и оценивали динамику восстановления интенсивности флуоресценции. Рассчитывали степень восстановления интенсивности флуоресценции (I_{∞}), период полувосстановления ($t_{1/2}$) и коэффициент диффузии. Кластерный анализ позволил разделить включения на 2 класса, характеризующиеся разными параметрами восстановления. Подобные различия вероятнее всего свидетельствуют о разнице в структуре сформированных включений. Их можно объяснить различиями как в скорости латеральной диффузии флуоресцирующих молекул в ROI, так и рефолдинге обесцвеченных амилоидных фибрилл. Анализ таблиц совместимости показал, что в

присутствии полимера аминоимидазолриботида, при культивировании клеток в течение 8 ч, доля включений с пониженной степенью восстановления увеличивается.

СОСТАВ ХРОМОЦЕНТРОВ МЫШИ *IN SILICO* И *IN SITU*. Д.И.Остромышенский,¹ Е.Н. Черняева,² И.С. Кузнецова,³ О.И. Подгорная.^{1,2} ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, ³The Chinese University of Hong Kong, Shatin, Hong Kong, *necroforus@gmail.com*.

Конститутивный гетерохроматин (ГХ) является самой неизученной частью генома. В ядрах домовой мыши ГХ формирует хромоцентры, которые возможно выделить биохимически. Определили состав хромоцентров мыши двумя способами: (1) в клонотеке, полученной после амплификации ДНК хромоцентров на DOP-праймере; (2) риды после секвенирования на MiSeq ДНК хромоцентров анализировали методами биоинформатики. (1) Из клонотеки отобрали 38 клонов. 4 клонa представляют из себя мажорный сателлит мыши (MaCat); 16 отсутствуют в эталонном геноме, но есть в контигах полногеномной сборки; 18 клонов являются фрагментами длинных диспергированных элементов (LINE). 13 клонов картированы методом FISH. 3 клонa показали дисперсное распределение, но остальные принадлежат центромерному (ЦЕН) району и хромоцентрам, несмотря на то, что являются фрагментами LINE. Картировали клоны сходные с LINE на консенсусные последовательности LINE из RepBase. Основная масса производных от LINE клонов (13 из 18) расположена в конце 2-й открытой рамки считывания (ORF2) и прилежащем 3'-нетранслируемом регионе (UTR) LINE. (2) Провели биоинформатический анализ ридов хромоцентров (ChrmC). В ChrmC наиболее представлены tandemные повторы (ТП) — MaCat (~66%), минорный сателлит мыши (МиCat) (~4%) и ~1% недавно описанные ТП (Komissarov et al., 2011). Часть «новых» ТП картировали на хромосомах с помощью FISH и показали их расположение в ЦЕН и хромоцентрах. На втором месте по содержанию — LINE (~11%). Анализ покрытия консенсуса L1_MM ридов ChrmC показал обогащение в конце ORF2 и 3'-UTR. На третьем месте по содержанию в ChrmC оказались эндогенные ретровирусы (ERV) (~9%). Наиболее представленными оказались ERV2 и в особенности IAP, в то время как в геноме в целом наиболее представлены MaLR-ERV (ERV3). Обогащенность ГХ IAP подтвердили *in situ*. Анализ покрытия консенсусных последовательностей ERV показал отсутствие обогащения какими-либо фрагментами. Риды ChrmC собрали в контиги с помощью IDBA_UD. Среди контигов половина аннотирована как фрагменты ERV. Контиги покрывают консенсусные

последовательности ERV почти полностью, что может свидетельствовать о присутствии полноразмерных ERV в ГХ. Во второй половине контигов найдены контиги, картирующиеся рядом с центромерным пробелом в эталонном геноме, а также неизвестные повторяющиеся последовательности половых хромосом.

Работа поддержана грантами МКБ (№ 01.2.01457147) и РНФ (15-15-20026)

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ТКАНЕЙ ГЛАЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДНЫХ ГЛАЗНЫХ КАПЕЛЬ. © Д.А. Переплетчикова,^{1,3} Т.В. Машель,^{1,3} К.Э. Журенков,^{2,3} Г.А. Писугина,^{2,3} Ю.И. Хорольская,³ О.И. Александрова,³ И.Н. Околов,⁴ М.И. Блинова.³ ¹ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, ²ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, ³ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ⁴Санкт-Петербургский филиал ФГАУ «МНТК Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова МЗ РФ, Санкт-Петербург, *dasha_perepletech@mail.ru*.

Современная фармацевтическая промышленность ежегодно выпускает на рынок большое количество новых лекарственных препаратов. Прежде чем дойти до потребителя, все они проходят особый контроль качества, так как любой препарат в той или иной степени может оказывать токсическое действие на организм.

Исследования потенциальной опасности лекарственных средств на лабораторных животных до сегодняшнего дня остаются «золотым стандартом». Однако зачастую традиционные методы являются дорогостоящими и недостаточно информативными. Одним из перспективных направлений оценки цитотоксичности лекарственных средств является использование клеточных тест-систем в условиях *in vitro*. Они дают более быстрый ответ по сравнению с тестированием в условиях *in vivo*, а доступность используемого материала значительно упрощает исследование.

Для профилактики и терапии воспалительных заболеваний глаз в офтальмологии часто применяют глюкокортикостероидные капли. Правильный выбор глазных капель позволит минимизировать вероятность возникновения побочных эффектов у пациента, вызванных цитотоксическим действием препарата.

Цель данной работы состояла в исследовании возможности использования клеточных тест-систем на основе клеток тканей глаза человека для оценки цитотоксичности глюкокортикостероидных глазных капель (Дексаметазон (Д), Офтан®

Дексаметазон (ОД), Максидекс® (М)) в условиях *in vitro*. В качестве тест-систем применяли клетки постоянных трансформированных клеточных линии роговицы (НЕСЕ) и конъюнктивы человека (Clone 1-5C-4), а также лимбальные стволовые клетки (ЛСК). Цитотоксическое действие исследуемых препаратов в отношении клеточных тест-систем оценивали по жизнеспособности клеток, используя методы световой микроскопии и МТТ-теста.

В ходе исследования было выявлено, что использованные тест-системы обладают различной чувствительностью к одним и тем же лекарственным препаратам.

Установлена прямая зависимость между концентрацией исследуемых препаратов в питательной среде и их цитотоксичностью.

Проведенное исследование показало принципиальную возможность использования культивируемых клеток в условиях *in vitro* для сравнительной оценки цитотоксического действия различных офтальмологических препаратов.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ 14-50-00068.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ, КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ И СИНТЕЗ РНК И ДНК ИНВАЗИВНЫХ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ *PROROCENTRUM MINIMUM*. С.А. Печковская¹, Н.А. Князев^{1,2}, С.О. Скарлато¹, И.В. Телеш^{1,3}, Н.А. Филатова¹. ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ²Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет РАН; ³Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, juliya_94@inbox.ru.

В настоящей работе исследован потенциально токсичный миксотрофный планктонный вид динофлагеллят *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller, появившийся в Балтийском море более трех десятилетий назад, где он стал периодически вызывать обширные «цветения воды» в прибрежных водах в конце XX века, а к 2000 году был зарегистрирован также и в олигогалинных водах Финского залива. Однако причины столь успешного распространения этих организмов, а также биохимические и физиологические механизмы их эффективной адаптации к экстремальным изменениям окружающей среды до настоящего времени остаются недостаточно исследованными. Отсутствуют данные о биомаркерах стресса, которые важны для прогностической оценки условий, необходимых для процветания динофлагеллят в водных экосистемах. Уровень синтеза РНК и ДНК определяли по включению в клетки ³H-уридина или ³H-тимидина соответственно. Анализ показал, что после температурного воздействия (37 °С или 42 °С) синтез РНК

увеличивался в 1,7-3,1 раз, а синтез ДНК – в 1,2-1,9 раз по сравнению с контролем (25 °C) в зависимости от продолжительности температурного стресса. Методом проточной цитометрии было установлено, что после температурной обработки процент погибших клеток не превышал 20% от общего числа клеток. Повышение температуры не приводило к изменению распределения клеток по фазам клеточного цикла. Полученные данные свидетельствуют о том, что значительное увеличение синтеза нуклеиновых кислот служило своеобразным биомаркером стресса, обусловленного изменениями параметров окружающей среды.

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

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ СЛЕЗОЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ НА КЛЕТКИ ТКАНЕЙ ГЛАЗА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*. © Г.А. Писугина^{1,2}, О.И. Александрова², Ю.И. Хорольская², И.Н. Околов³, К.Э. Журенков^{1,2}, Т.В. Машель⁴, Д.А. Переплетчикова⁴, М.И. Блинова². ¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ³ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Санкт-Петербург, ⁴Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, *forssk@yandex.ru*.

Лечение синдрома «сухого глаза» – патологического состояния глаза, возникающего в результате пониженной выработки слез или повышенной испаряемости слезы – актуальная проблема современной офтальмологии. Этот синдром часто является сопутствующим диагнозом при множестве глазных заболеваний. Важную роль в лечении синдрома «сухого глаза» играют препараты слезозаместительной терапии (ПСТ). Состав ПСТ включает, как правило, три компонента: лубриканты, наполнители и консерванты. Их концентрация в составе глазных капель, является относительно низкой, однако кумулятивная доза за весь период использования, может оказаться высокой, т.к. глазные капли «искусственных слез» закапываются пациентами, как правило, в течение многих лет. Это особенно важно помнить, в контексте развития побочных эффектов, которые могут быть вызваны некоторыми вспомогательными ингредиентами, входящими в состав глазных капель, в том числе и ПСТ, например, консервантами, или стабилизирующими агентами, некоторые из которых, как известно, обладают цитотоксическим действием. В исследованиях токсичности новых и уже существующих лекарственных препаратов в

последнее время все чаще находят применение тест-системы *in vitro*. Наиболее простыми и доступными среди них являются модели с использованием монослойных клеточных культур.

В данном исследовании была проведена сравнительная оценка цитотоксичности ПСТ в условиях *in vitro*. В качестве тест-систем были использованы трансформированные клетки нормальных тканей глаза: постоянные трансформированные клеточные линии конъюнктивы (Chang Conjunctiva, Clone 1-5с-4) и роговицы (HCEC) человека и первичной линии лимбальных стволовых клеток. Цитотоксическое действие препаратов в отношении клеточных тест-систем оценивали по морфологии клеток и их метаболической активности с использованием методов световой микроскопии и МТТ-теста. Так же была разработана модель сухого глаза *in vitro*, для исследования защитного действия ПСТ в отношении клеток роговицы.

В ходе данной работы было показано, что клеточные тест-системы позволяют выявить различную степень токсического эффекта, оказываемого лекарственными средствами на клетки тканей глаза. Кроме того, исследования с использованием модели сухого глаза позволили выявить различную степень защитного эффекта исследуемых лекарственных средств. Проведённые исследования показали принципиальную возможность использования систем *in vitro* для сравнительной оценки цитотоксического действия ПСТ.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ 14-50-00068.

ЯДРЫШКО И ОКОЛОЯДРЫШКОВЫЙ ГЕТЕРОХРОМАТИН КЛЕТОК ПУРКИНЬЕ КОРЫ МОЗЖЕЧКА КРЫСЫ. © И.М. Плешакова, Д.А. Суфиева. Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, Отдел общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Laylay.96@mail.ru.

Клетки Пуркинье – грушевидные нейроны коры мозжечка – привлекают внимание многих исследователей, поскольку являются крупными конечно-дифференцированными клетками с высокой синтетической активностью, выполняют важнейшие регуляторные функции в обеспечении координации движения и их дегенерация обуславливает ряд заболеваний нервной системы. В виду возросшей актуальности изучения особенностей структурно-функциональной организации ядер нервных клеток, нами были исследованы

некоторые субкомпарменты ядер клеток Пуркинье, в частности – ядрышко и околядрышковый гетерохроматин.

Материалом для исследования послужили фрагменты мозжечка головного мозга половозрелых крыс-самцов линии Вистар (n=3). Срезы были окрашены с использованием иммунофлуоресцентных методов и поликлональных антител к гистону H4 триметилированного по лизину 20-ть –H4K20me3 (Abcam), который является маркером гетерохроматина, а также моноклональных антител к нуклеофозмину (клон FC82291, Sigma-Aldrich) – маркеру ядрышек. Продукт реакции выявляли при проведении конфокальной лазерной микроскопии.

Установлено, что ядрышко клеток Пуркинье не содержит фибриллярного центра, что подтверждает их высокую синтетическую активность. Было показано, что гистон H4K20me3 входит в состав околядрышкового гетерохроматина. Кроме того, было продемонстрировано наличие небольших агрегатов H4K20me3 в самом ядрышке, что указывает на возможную роль этого белка в стабилизации структурного устройства и функционировании ядрышка.

ЭВОЛЮЦИЯ СЕМЕЙСТВА ЧЕТЫРЕХДОМЕННЫХ ПОТЕНЦИАЛ-УПРАВЛЯЕМЫХ КАТИОННЫХ КАНАЛОВ. © И.А. Поздняков. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, pozdneyakov@incras.ru.

Потенциал-управляемые натриевые (Na_v) и кальциевые (Ca_v) каналы животных, а также их гомологи характеризуются схожей псевдотетрамерной организацией порообразующей субъединицы и объединяются в семейство четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов (ЧД ПКК). На сегодняшний день можно выделить четыре подсемейства с хорошо охарактеризованными представителями: 1) Na_v-каналы 2) Ca_v-каналы, активируемые на высоких потенциалах (HVA Ca_v), 3) Ca_v-каналы, активируемые на низких потенциалах (LVA Ca_v), 4) группа потенциал-неуправляемых катионных каналов, объединяющая натриевые каналы утечки животных NALCN и депонуправляемые кальциевые каналы грибов Sch. Важно отметить, что распространение представителей всех перечисленных подсемейств ограничено организмами супергруппы Opazoa, включающей животных, хоанофлагеллят, грибов, апусомонад и ряд других протистов. В тоже время известны ЧД ПКК эукариот, не родственных Opazoa, например, Ca_v-каналы зеленых водорослей и инфузорий, которые нередко ошибочно объединяют с Ca_v-каналами животных.

В настоящей работе с помощью методов молекулярной филогении и биоинформатики было исследовано филогенетическое и структурное разнообразие ЧД ПКК эукариот. Анализ ЧД ПКК шестнадцати различных групп эукариот показал, что: 1) реальное разнообразие ЧД ПКК не укладывается в существующее представление о четырех подсемействах этих каналов; 2) многие группы эукариот обладают своими собственными ЧД ПКК, не относящимися ни к одному из охарактеризованных подсемейств, 3) селективный фильтр вида Е/Е/Е/Е, аргинин/лизин-богатые сегменты S4, Na_v-подобный мотив инактивационных ворот, присутствие доменов связывания кальмодулина – pre-IQ и IQ, а также отсутствие домена связывания дополнительной субъединицы Ca_vβ и детерминант, определяющих чувствительность к низким концентрациям тетродотоксина (ТТХ), представляют собой анцестральные признаки в этом семействе каналов. Кроме того, в настоящей работе продемонстрировано, что появление «канонического» сайта докинга инактивационных ворот связано с эволюцией каналов подсемейства Na_v в линии Metazoa, а возникновение детерминант высокого сродства к ТТХ – с появлением каналов Na_v1.

Финансовая поддержка РФФИ, проект 16-14-10116.

ПОИСК БЕЛКОВ-ПАРТНЕРОВ БЕЛКА ДЕЛЕНИЯ FTSZ В КЛЕТКАХ *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* И *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII*. © В.С. Полиновская,^{1,2} А.Д. Ведяйкин,^{1,2} А.В. Дробышева,^{1,2} В.А. Иванов,¹ И.Е. Вишняков.¹ ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ²Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, misterkotlin@gmail.com.

Микоплазмы – класс патогенных бактерий, не имеющих клеточной стенки. Они являются возбудителями серьёзных заболеваний человека, животных и растений. Борьба с микоплазмами осложнена тем, что микоплазмы до сих пор недостаточно изучены. Например, практически не исследован процесс деления клетки микоплазмы. В клетках большинства изученных бактерий за этот процесс отвечает белок FtsZ, где он формирует каркас для дивисомы – комплекса белков, обеспечивающих цитокинез. Однако роль FtsZ в делении клеток микоплазм не ясна, поэтому целью данной работы было определить белки, взаимодействующие с белком FtsZ в микоплазменной клетке на примере *Mycoplasma gallisepticum* и *Acholeplasma laidlawii*.

Для идентификации белков-партнёров FtsZ использовали метод ко-иммунопреципитации. Были получены рекомбинантные белки FtsZ двух микоплазм, к

ним были наработаны кроличьи поликлональные антитела. Специфичность антител была подтверждена методом иммуноблоттинга. Для ко-иммунопреципитации использовали антитела к FtsZ, ковалентно связанные с белок А-сефарозой. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку неиммунизированных животных. Белки из клеточных экстрактов микоплазм, связавшиеся с теми или иными антителами, идентифицировали с помощью масс-спектрометрического анализа. Полученные нами данные по белкам-партнёрам свидетельствуют о том, что белки FtsZ указанных видов микоплазм действительно вовлечены в цитокинез, в частности, предположительно, в процессы репликации и сегрегации ДНК. Для подтверждения взаимодействия идентифицированных белков с FtsZ микоплазм в дальнейшем планируется использовать метод бактериальной двугибридной системы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №17-74-20065).

ИЗУЧЕНИЕ АГРЕГАЦИИ ПРИОННОГО БЕЛКА SUP35 МЕТОДОМ ДРС. © М А Попова, В.Е. Акулов, М.В. Белоусов, П.А. Соколов. СПбГУ, Санкт-Петербург, porovataaria@gmail.com.

Мотивация изучения амилоидов в основном связана с их способностью вызывать тяжелые нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Куру, Альцгеймера, Паркинсона, Крейтцфельда-Якоба и другие. Для этих болезней характерна общая черта патогенеза — формирование амилоидов, приводящее к гибели нейронов. Амилоиды представляют собой фибриллярные отложения, образованные функциональными белками в результате их неправильной укладки. Белок дрожжей Sup35 выступает в качестве удобной модельной системы для изучения механизмов образования и распространения амилоидов, понимание которых может быть крайне ценно для исследования амилоидных, в частности прионных, заболеваний человека и млекопитающих. Существует ряд моделей для описания амилоидогенеза, однако детальный механизм перехода белков в амилоидную форму на данный момент остается неизвестным.

Для исследования амилоидообразования применяют ряд различных методик, таких как микроскопия, метод кругового дихроизма, флуоресценция в присутствии тиофлавина Т, инфракрасная спектроскопия. Динамическое рассеяние света также может быть использовано для изучения агрегации белка, это широко используемый метод для измерения коэффициента поступательной и вращательной диффузии, с помощью

которого можно оценить распределение амилоидов по длинам в зависимости от времени с начала агрегации. При этом полученные распределения с высокой точностью совпадают с аналогичными данными, полученными при помощи сканирующей электронной микроскопии.

Для получения данных зависимостей нами было разработано несколько экспериментальных методик и способов обработки данных. При помощи моделирования в программе HYDROPIX и аналитических формул были получены зависимости коэффициентов диффузии от длин фибрилл. С использованием программного пакета NFM-DS методом Т-матриц были рассчитаны зависимости дифференциальных сечений рассеяния фибрилл от их длины. Была разработана и верифицирована программа для пакетной обработки автокорреляционных функций методом CONTIN. Это позволило количественно описать процесс агрегации прионного дрожжевого белка Sup35N^{Mr}.

IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЕ МИГРАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕРИРЕНАЛЬНОГО ЖИРА КРЫСЫ. А.В. Ревитцер,¹ Ю.А. Негуляев^{1,2}. ¹Кафедра медицинской физики Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *eetytnet@gmail.com*.

Миграция - это ключевое свойство живых клеток. Клеточная подвижность имеет определяющее значение в большом ряде нормальных и патологических процессов, таких как эмбриональное развитие, иммунный ответ, заживление раны, васкуляризации опухолей и метастазировании раковых клеток. Способы оценки клеточной миграции находят свое применение в разных областях биологии: клеточная биология, биология развития, исследования в области рака и иммунология. Но, тем не менее, несмотря на большое количество исследований, понимание процесса и механизмов направленного движения клеток остается неясным. Существуют различные методы для исследования миграции клеток *in vitro*, однако один из самых удобных и простых для воспроизведения - модель заживления раны, нанесенной на монослой клеток (*wound closure assay*, Justus, 2014). Существенное преимущество этого метода в том, что подобное исследование можно организовать, имея базовое оборудование для работы в области клеточной биологии.

В нашей работе были выделены мезенхимные стволовые клетки (МСК) из периренального жира крысы Wistar и частично охарактеризованы. Так же мы провели с

ними ряд экспериментов по методу *wound closure assay*: высевали полученные клетки (4 пассаж) в культуральный планшет (плотность 10000 клеток на 1 см²), доводили до конfluence в питательной среде и наносили наконечником (для дозатора) объемом 200 мкл экспериментальную рану шириной 300 - 350 мкм. Далее с помощью микроскопа AxioVision Z1 (Zeiss, Германия), оборудованного устройством для поддержания 37 °C, 5% CO₂ и необходимой влажности, проводили съемку нативного препарата МСК с нанесенной раной с частотой 1 кадр в 10 минут. Среднее время заживления раны, нанесенной на монослой МСК, выделенных из периренального жира крысы, составило 10,5 часов.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОГО АНАЛОГА ThT, DMASEBT, В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ И ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С АМИЛОИДНЫМИ ФИБРИЛЛАМИ. © Н.П. Родина,^{1,2} А.И. Сулацкая,² О.И. Поварова,² М.И. Сулацкий,² И.М. Кузнецова,² К.К. Туроверов^{1,2} ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург, nrodina@incras.ru.

Накопление в тканях и органах организма амилоидных фибрилл, сопутствует многим тяжелым заболеваниям, таким как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, прионные болезни и др. Для диагностики образования и исследования структуры этих упорядоченных белковых агрегатов эффективно используется флуоресцентный зонд тиофлавин Т (ThT), изменяющий свои фотофизические характеристики при инкорпорировании в фибриллы. Однако спектральные характеристики ThT не позволяют применять его для исследования амилоидных фибрилл *in vivo*. В настоящей работе были исследованы фотофизические свойства нового аналога тиофлавина Т – транс-2-[4-(диметиламино)стирил]-3-этил-1,3-бензотиазолия перхлората (DMASEBT), в свободном состоянии в водных растворах (в широком диапазоне pH), водно-глицериновых смесях и при связывании с амилоидными фибриллами. Показано, что спектры поглощения и флуоресценции этого флуоресцентного зонда сдвинуты в длинноволновую область по сравнению со спектрами ThT. С использованием специально разработанного подхода, основанного на абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии растворов, подготовленных методом равновесного микродиализа, показано, что встраивание DMASEBT в амилоидные фибриллы на основе инсулина приводит к длинноволновому сдвигу его спектров поглощения и флуоресценции, а также к значительному возрастанию

квантового выхода и времени жизни затухания флуоресценции красителя. Кроме того, показано, что константы связывания ThT и DMASEBT с амилоидными фибриллами на основе инсулина имеют один и тот же порядок.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что связывание DMASEBT с амилоидными фибриллами приводит к изменению его фотофизических характеристик (что существенно для флуоресцентного зонда), при этом механизм его взаимодействия с фибриллами аналогичен механизму связывания ThT, а спектральные свойства DMASEBT улучшены по сравнению со свойствами ThT. Таким образом, DMASEBT является перспективным инструментом для диагностики образования амилоидных фибрилл и изучения их структуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 16-04-01614_а и 18-54-00022_Бел и стипендии Президента РФ СП-841.2018.4.

УЧАСТИЕ V_{1b} -РЕЦЕПТОРОВ И V_2 -РЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСПОРТА КАЛИЯ И МАГНИЯ В ПОЧКЕ КРЫС. © Ю.А. Савина, Д.В. Голосова. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, savina.yula@gmail.com.

Ионорегулирующая функция почек осуществляется при участии нонапептида аргинин-вазопрессина (АВП), эффект которого опосредован взаимодействием с V_{1a} , V_{1b} и V_2 -рецепторами. Для изучения функциональной роли рецепторов гормонов в нефроне применяют их специфические агонисты и антагонисты. Задача настоящей работы - исследование роли V_{1b} - и V_2 -рецепторов в регуляции выведения K^+ , Mg^{2+} .

Эксперименты проведены на крысах Wistar, которым вводили АВП, V_2 -агонист (дДАВП), дезамино-аргинин-вазотоцин (дААВТ), V_{1b} -антагонист. Мочу собирали в течение 4ч при произвольных мочеиспусканиях. Результаты приведены в виде $M \pm m$. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Все данные и дозы представлены на 100 г м.т. АВП в дозах 0.5-2 нмоль стимулировал экскрецию K^+ и снижал выведение Mg^{2+} . При введении гормона в дозе 0.5 нмоль экскреция K^+ увеличилась с 20 ± 2 до 74 ± 8 мкмоль/2ч ($p < 0.05$), Mg^{2+} - снизилась с 5.42 ± 0.43 до 4.07 ± 0.7 мкмоль/2ч ($p < 0.05$). При инъекции дДАВП в дозах 0.01-0.05 нмоль экскреция K^+ возросла за 2ч почти в 4 раза ($p < 0.05$ к контролю), выведение Mg^{2+} не изменилось. Увеличение дозы агониста до 0.1 нмоль привело к росту экскреции K^+ до 45 ± 5 мкмоль/2ч ($p < 0.05$) и снижению экскреции

Mg^{2+} до 3.1 ± 0.3 мкмоль/2ч ($p < 0.05$). При стимуляции V-рецепторов дААВТ отмечено селективное усиление калийуреза (с 17 ± 2 до 66 ± 8 мкмоль/2ч, $p < 0.05$) без влияния на экскрецию других ионов. При блокаде V_{1b} -рецепторов на фоне действия дААВТ выведение K^+ уменьшилось в 2 раза ($p < 0.05$).

Полученные результаты показали, что стимуляция V_2 -рецепторов усиливает реабсорбцию Mg^{2+} . А стимуляция V_{1b} -рецепторов усиливает секрецию K^+ . Таким образом, V_{1b} - и V_2 -рецепторы участвуют в регуляции транспорта K^+ и Mg^{2+} в почке.

Работа выполнена в рамках государственного задания (№АААА-А18-118012290371-3) и частично поддержана грантом РФФИ № 18-34-00661.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ БЕТУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОЦЕСС НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ В НИГРОСТРИАТНОЙ СИСТЕМЕ, ХАРАКТЕРНЫЙ ДЛЯ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА © М.Р. Садыкова, Д.В. Плаксина, И.В. Екимова Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, *st041929@student.spbu.ru*.

Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое до сих пор относится к числу неизлечимых. Причины неизлечимости – поздняя постановка диагноза, когда основная часть нейронов погибла в нигростриатной системе, и несоответствие традиционного лечения современному представлению о молекулярных механизмах патогенеза БП. В настоящее время ослабление активности убиквитин-протеасомной системы рассматривается как один из молекулярных механизмов патогенеза БП. Бетулиновая кислота (БК) относится к числу малых молекул и рассматривается как потенциальный активатор протеасом. Показано, что превентивное введение БК в модели болезни Альцгеймера у крыс улучшает память, эмоциональное поведение и электрофизиологические показатели гиппокампальных нейронов [Navabietal., 2018].

В задачу данной работы входило изучить эффекты бетулиновой кислоты на выживаемость дофамин(ДА)-ергических нейронов и моторное поведение в модели нейродегенерации нигростриатной системы у крыс, характерной для БП.

Эксперименты проведены на самцах крыс популяции Вистар в возрасте 6–7 мес. Для создания модели нейродегенерации нигростриатной системы использовали ингибитор протеасом лактацистин (ЛЦ). ЛЦ вводили через заранее вживленные канюли в компактную часть черной субстанции (кчЧС) дважды, с интервалом в 7 дней. БК вводили в/б через 2 ч

после микроинъекций ЛЦ. На 21-й день после первого введения ЛЦ проводили тест «сужающая дорожка» для оценки моторного дефицита конечностей. Регистрировали время прохождения животным сужающейся доски, количество ошибок при прохождении широкой, средней и узкой части доски и количество шагов. По окончании поведенческих тестов животных декапитировали для проведения иммуногистохимических исследований. Для маркирования дофамин-(ДА)-ергических нейронов использовали поликлональные антитела против тирозингидроксилазы.

Поведенческие опыты показали, что группа крыс, которым вводили ЛЦ, совершала больше ошибок при прохождении «сужающейся дорожки» и тратила больше времени на пробежку по ней по сравнению с контрольной. Это указывает, что введение ЛЦ в кЧС вызывает развитие моторного дефицита конечностей у крыс. Введение БК модельным животным приводило к уменьшению количества ошибок при прохождении «сужающейся дорожки» и времени на пробежку. Выяснено, что при введении ЛЦ количество выживших ДА-ергических нейронов в кЧС уменьшилось на 58% относительно контроля. После введения БК количество выживших ДА-ергических нейронов приближалось к контрольным значениям у модельных животных. Полученные данные указывают, что системное введение БК препятствует проявлению моторных нарушений и ослабляет гибель ДА-ергических нейронов в черной субстанции в модели болезни БП у крыс. Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012290427-7).

НЕОБЫЧНЫЕ УДВОЕННЫЕ ТРАНСКРИПТЫ, КОДИРУЮЩИЕ HCN-ПОДОБНЫЕ КАНАЛЫ, У ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ И ООМИЦЕТОВ. © П.Ю. Сафонов,^{1,2} И.А. Поздняков.¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, *spy.ixz@gmail.com*.

Управляемые циклическими нуклеотидами гиперполяризационно-активируемые каналы (HCN) принадлежат к суперсемейству калиевых каналов, куда также входят K_v, CNG и EAG каналы. Высокая степень родства между представителями этих групп проявляется в таких особенностях структурной организации, как, например, субъединичный состав и строение поры, которая имеет характерный GYG-мотив.

Ранее при анализе транскриптомов динофлагеллят и оомицетов нами были обнаружены последовательности HCN каналов, которые обладают нехарактерным для представителей этих семейств удвоенным субъединичным составом. Присутствие подобных удвоенных последовательностей может быть либо артефактом сборки

транскриптома, либо результатом экспрессии реально существующих дублированных генов. Первая гипотеза представляется менее вероятной, так как удвоенные последовательности выявлялись в независимо собранных транскриптомах. Чтобы проверить вторую гипотезу мы провели работу по реконструкции предполагаемой линкерной области последовательности генов удвоенных каналов динофлагеллят. Для этого были подобраны праймеры к различным частям гипотетического удвоенного канала, проведены ПЦР и отсеквенированы полученные продукты.

Кроме того, нами была проведена реконструкция филогении HCN-подобных каналов, в анализ вошли и удвоенные последовательности. Поиск проводился в базах данных аминокислотных последовательностей NCBI и транслированных транскриптомах Marine Microbial Eukaryotic Transcriptome Sequencing Project представителей исследуемых групп эукариот. Реконструкция филогении проводилась с помощью метода максимального правдоподобия. Помимо этого, был проведен биоинформационный анализ первичной структуры важнейших функциональных элементов каналов: селективного фильтра с GYG-мотивом, сегмента S4, а также домена связывания с циклическими нуклеотидами (CNBD).

КЛОНАЛЬНЫЕ СУБЛИНИИ С ПРИЗНАКАМИ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА: ОРГАНИЗАЦИЯ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА. © *Е.И. Сахенберг, Н.П. Терюкова, С.А. Снопов*. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, lenasakhenberg@yandex.ru.

Для изучения метастатических опухолевых стволовых клеток (ОСК) мы эксплантировали клетки асцитной гепатомы Зайдела крысы в культуру *in vitro* и клонировали из них клеточные сублинии с разным уровнем дедифференцировки. Крупные эпителиоподобные клетки мероклональных сублиний (МС) образуют монослой с плотными межклеточными контактами, способны к коллективной миграции, не туморогенны. Мелкие фибробластоподобные клетки трех голоклональных сублиний (ГС) формируют рыхлый монослой, передвигаются индивидуально по мезенхимному и/или амебоидному типу, инициируют развитие асцитной опухоли. В настоящей работе мы сравнили актиновый цитоскелет у клеток МС и ГС. Клетки высевали на покровные стекла, окрашивали родамином-фаллоидином и исследовали с помощью конфокального микроскопа. В эпителиоподобных клетках МС актин сосредоточен в большом числе параллельно ориентированных, проходящих через всю клетку стресс-фибрилл; в более

мелких клетках мезенхимного типа обнаруживаются мощный актиновый тяж по периметру стабильного края и многочисленные агрегаты актина в центре вокруг ядра; часть клеток образуют ламеллиподии, заполненные тонкой сетью микрофиламентов. В ГС выявлены гомогенные популяции мелких (округлых или вытянутых) клеток мезенхимного и амебоидного типов. Амебоидные клетки имеют на переднем крае ламеллиподию, на заднем – актиновый хвост, прикреплённый к субстрату, по периферии клетки – тонкий актиновый тяж и протрузии (филоподии и мелкие ламеллиподии). Актин внутри клеток ГС не организован, – стресс-фибриллы отсутствуют, что характерно для трансформированных клеток с повышенной локомоторной активностью и способностью к метастазированию. Известно, что для адгезии и миграции фибробластного типа клетке необходимы фокальные контакты, образуемые на концах пучков стресс-фибрилл. При их отсутствии клетка слабее прикрепляется к субстрату и может быстрее передвигаться, не тратя время на образование и разборку фокальных контактов. Таким образом, мы впервые установили, что миграторный фенотип ОСК гепатомы Зайдела связан с редукцией стресс-фибрилл.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИММУНОПРОТЕАСОМ В НАИВНЫХ И ПРАЙМИРОВАННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ. © *А.В. Селенина, Е.И. Бахмет, А.Н. Томилин, А.С. Цимоха*. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *a.selenina@incras.ru*.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), получаемые из эпибласта доимплантационных эмбрионов, и эпибластные стволовые клетки (ЭпиСК), происходящие из эпибласта после имплантации, относят к наивным и праймированным плюрипотентным клеткам, соответственно. Эти два состояния характеризуется различными паттернами экспрессии и активностью сигнальных каскадов, однако, в то же время, имеют общие характеристики, как, например, экспрессию ключевых факторов плюрипотентности – Oct4, Sox2 и Nanog. Убиквитин-протеасомная система контролирует практически все основные клеточные процессы посредством регулируемой деградации белков, но несмотря на большой интерес к плюрипотентным клеткам, исследований, направленных на изучение белкового гомеостаза в ЭСК и ЭпиСК с помощью убиквитин-протеасомной системы, крайне мало. Протеасома состоит из коровой 20S и одной или двух регуляторных 19S частиц. Существует также дополнительный регулятор протеасом – PA28, который увеличивает эффективность деградации белков. При определенных

условиях конститутивные каталитические субъединицы 20S коровой частицы $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ могут замещаться на особые субъединицы – $\beta 1i/LMP2$, $\beta 2i/MECL-1$ и $\beta 5i/LMP7$, формируя иммунопротеасому. Известно, что в процессе дифференцировки ЭСК мыши наблюдается увеличение экспрессии субъединиц иммунопротеасом $\beta 5i/LMP7$ и PA28 частицы, что говорит о важной роли данных участников убиквитин-протеасомной системы. Биоинформатический анализ результатов РНК-секвенирования показал различный паттерн экспрессии субъединиц иммунопротеасом в ЭСК и ЭпиСК мыши, что свидетельствует о роли иммунопротеасом в переходе между различными плюрипотентными состояниями СК. Используя N2B27+2i+LIF среду, из культуры ЭСК мыши мы получили наивные СК. При культивировании однородных наивных СК в среде N2B27+Activin+FGF+KSR мы получили ЭпиСК-подобные клетки, в которых с помощью иммуноблоттинга было обнаружено, что, начиная с 11 дня дифференцировки в праймированные ЭпиС-подобные клетки, синтезируются субъединицы иммунопротеасомы $\beta 5i/LMP7$ и PA28 частицы, при этом уровень Oct4 остается неизменным, что свидетельствует о роли данных комплексов в регуляции плюрипотентности праймированных клеток.

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

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ ВНУТРЕННЕ НЕУПОРЯДОЧЕННЫХ БЕЛКОВ В УСЛОВИЯХ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА. © А.К. Ситдикова,^{1,2} А.В. Фонин,¹ Ю.А. Гагарская¹, С.А. Силонов,¹ К.К. Туроверов,^{1,2} В.Н. Уверский³, И.М. Кузнецова.¹ ¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, ³Университет Флориды, Тампа, США, asia28298@yandex.ru.

Биомакромолекулы в клетке функционируют в условиях макромолекулярного краудинга. Такие условия ограничивают число конформаций, которые может принять полипептидная цепь. Это может способствовать сворачиванию полипептидной цепи в компактную структуру, но может также привести к агрегации и/или неправильному сворачиванию белка. В условиях макромолекулярного краудинга при изменении внешних условий (температуры, pH, и т.д.) возможно фазовое расслоение макромолекул с образованием высокодинамичных структур – немембранных органелл. Решающую роль при образовании немембранных органелл играют внутренне неупорядоченные белки

(IDPs), которые способны к мультивалентному взаимодействию с различными партнерами. Возможность образования внутренне неупорядоченными белками связей с партнерами существенно зависит от внешних факторов, таких как температуры, pH и т.д. Изучение механизмов, вызывающих различные конформационные переходы IDPs в условиях макромолекулярного краудинга *in vitro*, может помочь установить причины конформационных превращений IDPs.

Охарактеризованы pH-индуцированные конформационные переходы неупорядоченный клубок – альфа-спираль гомополипептидов поли-L-лизина (polyK) и поли-L-глутаминовой кислоты (polyE), а также внутренне неупорядоченных белков: линкерного гистона H1 и протимозина альфа, аминокислотные последовательности которых содержат около 30 % остатков лизина и глутаминовой кислоты, соответственно. Эксперименты выполнены в высококонцентрированных растворах PEG, имитирующих условия внутриклеточного окружения. Увеличение концентрации и молекулярной массы PEG вызывает существенное уменьшение кооперативности и сдвиг перехода между развернутой и структурированной формами polyK полипептида в сторону более кислых pH. Положение середины перехода неупорядоченный клубок – альфа-спираль для polyE не зависит ни от молекулярной массы, ни от концентрации PEG в исследуемых растворах, однако по мере увеличения концентрации и степени полимеризации краудинг-агента наблюдается существенное увеличение кооперативности перехода.

Установлено, что условия молекулярного краудинга практически не влияют на характеристики pH-индуцированного перехода линкерного гистона H1, но способствуют агрегации. В то же время для протимозина альфа и polyE в этих условиях обнаружено существенное увеличение кооперативности перехода. По-видимому, различное действие высококонцентрированных растворов PEG на аналогичные структурные переходы гомополипептидов и ID белков обусловлено различным соотношением между размером кластеров полиэтиленгликоля и размерами структурно-организованных доменов исследуемых полиаминокислот и ID белков.

Работа выполнена при поддержке РФФИ грант № 18-34-00975 мол_а (Ю.А.Г.) и стипендии президента СП-3665.2018.4 (А.В.Ф.).

ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА ГЕНЕРАЦИИ ЗРЕЛЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ИЗ
МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА. ©
А.О. Ситковская, Е.С. Бондаренко, О.Г. Шульгина. Федеральное государственное

бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, *grankina.anastasia@mail.ru*.

Для данной работы у здоровых доноров проводился забор периферической крови из локтевой вены в объеме 80-100 мл в пробирки для выделения моноклеарных клеток (МНК) (BD Vacutainer® CPT™). Использовали несколько комбинаций цитокинов с различной концентрацией: а) IL-4 42 нг/мл и GM-CSF 57 нг/мл; б) IL-4 20 нг/мл и GM-CSF 57 нг/мл; в) GM-CSF 57 нг/мл. Для созревания ДК применяли TNF-α (SCI Store). Инкубация проводилась в условиях 5% CO₂, 98% влажности и 37°C в CO₂ инкубаторе (Sanio) с использованием 15 мл/флакон (T75) среды Cell Gro (Cell Genix) в течение 12 дней. Применялись разные временные интервалы для адгезии МНК: 2 часа и сутки, что является подготовительным этапом перед непосредственным внесением во флаконы с клетками среды для дифференцировки ДК и факторов роста. Оценка степени дифференцировки проводилась по экспрессии поверхностных маркеров CD80, CD83, CD86, HLA DR на проточном цитофлуориметре BD FACSCantoII. Различия между временем инкубации моноклеарных клеток показали, что осаждение клеток в течение 2 часов приводит к большей экспрессии антигенов, которые были использованы в нашем исследовании. Использование IL-4 с концентрацией 42 нг/мл и GM-CSF 57 нг/мл культуральной жидкости продемонстрировало лишь небольшое увеличение выраженности маркеров по сравнению с первоначальным уровнем, в ряде случаев даже наблюдалось угнетение экспрессии. Введение в культуральную жидкость IL-4 с концентрацией 20 нг/мл и GM-CSF 57 нг/мл способствовало значительной экспрессии CD83, CD86, HLA DR на зрелых дендритных клетках. При добавлении лишь одного цитокина – GM-CSF (57 нг/мл) наблюдалось увеличение выраженности антигена CD83, однако показатели других антигенов, в том числе и их коэкспрессии, значительных отличий, по сравнению с другими сравниваемыми концентрациями, не демонстрировали. Полученные результаты требуют дальнейшего проведения исследований. На данный момент мы можем лишь констатировать тот факт, что для оптимальной адгезии моноклеарных клеток вполне достаточно 2-часовой инкубации.

АКТИВНОСТЬ ПОТЕНЦИАЛ-УПРАВЛЯЕМЫХ И ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫХ КАНАЛОВ В НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА 5xFAD МЫШЕЙ. © К.В. Скобелева, Е.Р. Михайлова, М.А. Рязанцева, Е.В. Казначеева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *ks.skobeleva@ya.ru*.

В патологии болезни Альцгеймера (БА) важную роль играет нарушение кальциевого гомеостаза. В данной работе изучали изменение активности потенциал-управляемых кальциевых каналов в зависимости от уровня кальция во внутриклеточных депо. В качестве модельных объектов были использованы культуры нейронов гиппокампа мыши с мутациями, ассоциируемыми с наследственной БА, в том числе нейроны трансгенных мышей линии 5xFAD APP/PS1. Было обнаружено увеличение содержания кальция во внутриклеточных депо и увеличение входа кальция в ответ на деполяризующий стимул. Избыточный кальциевый вход в ответ на деполяризацию блокировался нифедипином, ингибитором потенциал-управляемых кальциевых каналов L-типа. Известно, что активность этих каналов ингибируют кальциевые сенсоры эндоплазматического ретикула STIM1. Экспрессия мутантного пресенилина-1 снижает активацию и перемещение сенсора STIM1 к плазматической мембране при опустошении депо в клетках нейробластомы человека. Мы предполагаем, что в модельных нейронах вследствие накопления кальция в депо сенсоры STIM1 не блокируют активность кальциевых каналов L-типа, что приводит к избыточному входу кальция. Таким образом, кальциевые каналы L-типа можно рассматривать в качестве мишени для терапии БА.

Работа поддержана грантами РФФИ №16-34-00649 и РНФ №14-14-00720.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ И ДЕТЕКЦИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. © Д.Д. Смирнов,¹ Д.Д. Недорезова,¹ Д.В. Немирич,¹ Д.М. Колпащиков.^{1,2}

¹Университет ИТМО, Санкт-Петербург, ²Университет Центральной Флориды, США, smirnov@scamt.ru.

В современной медицине до сих пор не существует высокоэффективного и безопасного для человека способа терапии онкозаболеваний, несмотря на то, что рак является второй ведущей причиной смертности населения во всем мире. Методы лечения опухолей, такие как химиотерапия, лучевая терапия или гормональная терапия в той или иной степени оказывают негативное воздействие на организм человека в целом, и их последствия нередко сохраняются после выздоровления. Препараты таргетной терапии оказывают непосредственное воздействие на целевые молекулы, необходимые для роста опухоли и канцерогенеза, однако негативным следствием этого является отсутствие цитотоксической активности, способности убивать или повреждать опухолевую клетку. Применению таргетной терапии сопутствует значительно меньшее количество побочных

эффектов, однако данный подход не исключает их полностью, что в первую очередь определяется недостаточной селективностью разрабатываемых препаратов.

Для преодоления данной проблемы нами была разработана ДНК-наномашина на базе дезоксирибозима 10-23 для терапии онкологических заболеваний путем регулируемого подавления экспрессии генов домашнего хозяйства в раковых клетках. Новизна нашего подхода заключается в создании многофункциональной конструкции на биосовместимой и биоразлагаемой ДНК-платформе, которая позволяет с высокой специфичностью распознавать РНК-маркер, эффективно расщеплять целевую мРНК гена домашнего хозяйства, а также релаксировать вторичную структуру мРНК-мишени. Также отличительной особенностью ДНК-конструкции является бинарная структура дезоксирибозима 10-23, которая повышает специфичность связывания РНК, и позволяет осуществлять формирование активного центра исключительно в присутствии последовательности РНК-маркера.

Для выявления мутаций, ассоциированных с онкозаболеваниями, нами был разработан бинарный ДНК-аптамерный сенсор. В основе данного сенсора лежит ДНК аптамер, состоящий из двух цепей ДНК, и способный специфично связывать разработанный нами слабофлуоресцирующий краситель Дарохул-SH (Модификация красителя Дарохул). После формирования комплекса краситель-аптамер, интенсивность флуоресценции возрастает более чем в 100 раз, однако флуоресцентный сигнал проявляется лишь в том случае, когда аптамер связывается с анализируемой последовательностью РНК или ДНК. Бинарная структура позволяет как высокоспецифично распознавать комплементарную последовательность с точностью до 1 нуклеотида, так и снижает интенсивность фоновой флуоресценции до уровня, сопоставимого с свободным красителем. Предел детекции составляет 1.9нМ, что свидетельствует о необходимости амплификации, однако аптамерная структура в основе сенсора дает возможность применять его для детекции продуктов изотермической амплификации и осуществлять процесс в режиме реального времени.

CRISPR СКРИНИНГ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ
УСТОЙЧИВОСТИ К CAR-T ТЕРАПИИ © Е.Ю. Смирнов,¹ Е.К. Зайкова,¹
А.В. Петухов.^{1,2,3} ¹ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова», Санкт-Петербург, ²Казанский
федеральный университет, Казань; ³Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
alexey.sakhalin@gmail.com.

Использование генно-модифицированных Т-лимфоцитов экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR-T) является одним из быстро развивающихся направлений в терапии онкологических заболеваний. Несмотря на большие успехи при лечении лимфопролиферативных заболеваний данная технология оказалась малоэффективной в терапии солидных опухолей. Сольидные опухоли обычно имеют ряд как структурных, так и иммуносупрессивных барьеров, которые уменьшают противоопухолевый эффект иммунных клеток, в том числе и CAR-T. Мы поставили перед собой задачу выяснить какие гены кроме уже известных (лиганды PD1, CTLA4, LAG3 и другие) могут иметь иммуносупрессивный эффект для CAR-T терапии. Для решения поставленной задачи была использована активационная модификация системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 (каталитически инактивированный белок dCas9 объединенный с VP64 трансаактиваторным доменом и MS2-P65-HSF1 усилитель активации транскрипции) совместно с библиотекой направляющих РНК (SAM библиотека). Используемый нами подход предоставляет возможность провести активацию экспрессии одного гена из всех возможных вариантов 23430 генов в каждой отдельно взятой клетке модифицированной культуры клеток человека. Таким образом, после добавления селективного агента (CAR-T) и последующего секвенирования нового поколения (NGS) выживших клеток, может быть осуществлен первичный скрининг генов-иммуносупрессоров для CAR-T терапии.

Лентивирусным вектором нами был проведен перенос гена CD19 человека в клеточную линию HeLa. CD19 в данном случае является специфическим антигеном для анти-CD19 CAR-T терапии. В качестве негативного контроля была создана линия HeLa экспрессирующая LNGFR также путем вирусной трансдукции. Кроме того, полученные линии были трансдуцированы с помощью лентивирусных векторов dCAS-VP64_Blast, lentiMPN v2 и библиотеки направляющих РНК. Экспрессия трансгенов была подтверждена вестерн-блоттингом, проточной цитометрией и ПЦР с последующей визуализацией на агарозном геле. Модифицированные клетки собирались методом трипсинизации, а с выделенной из них геномной ДНК была получена проба для NGS.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-34-50167 "мол_нр"

ВЛИЯНИЕ ОТНОШЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ II ТИПА В КЛЕТКАХ E.COLI НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЗАЩИТЫ ОТ БАКТЕРИОФАГА. © С.В. Смирнов,¹ Н.Е. Морозова,^{2,3} М.А. Ходорковский,²

К.В.Северинов.^{2,3} ¹Институт Точной Механики и Оптики, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург, ³Сколковский институт науки и технологий, Москва, *sergeismirnoff@gmail.com*.

Система рестрикции-модификации (Р-М) - это один из видов систем защиты бактерий от чужеродной ДНК бактериофагов и плазмид. Действие системы Р-М II типа основано на работе двух ферментов: эндонуклеазы рестрикции, которая разрезает чужеродную ДНК в определенных сайтах узнавания, и метилтрансферазы, которая защищает эти же сайты путем метилирования. Если бактериофаг, попавший в клетку, подвергнется метилированию раньше, чем будет расщеплен рестриктазой, то заражение клетки произойдет, а потомство такого вируса будет также устойчиво к действию системы Р-М. Существует теория [1] предполагающая, что преодоление защитного действия таких систем бактериофагом зависит от относительных концентраций метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции в клетке. Чтобы проверить данное предположение, в нашей лаборатории была создана флуоресцентно-меченная система Р-М, в которой метилтрансфераза и эндонуклеаза рестрикции слиты с флуоресцентными белками, что позволяет оценивать их концентрацию в одиночных бактериальных клетках. Из-за высокой степени защиты изучать единичные акты заражения бактерий вирусом с помощью флуоресцентной микроскопии достаточно сложно, поэтому в данной работе создана искусственная система, позволяющая контролируемо изменять концентрации белков системы Р-М в клетках. Предварительные результаты показали, что дополнительное увеличение концентрации эндонуклеазы рестрикции в клетках приводит к увеличению защиты от вируса на полтора порядка.

1. F.N. Enikeeva, K.V. Severinov, M.S. Gelfand. Restriction-modification systems and bacteriophage invasion: who wins? // J Theor Biol, 2010. 266(4): p. 550-9.

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ HSP70 В КЛЕТКАХ ЛИНИИ MDA-MB-231, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ P53 ДИКОГО ТИПА И МУТАНТНЫЙ P53 R175H В ХОДЕ ОТВЕТА НА ТЕПЛОВОЙ ШОК. © *А.Н. Смотров*,¹ *М.А. Шкляева*,² *Н.А. Барлев*.²
¹СПбГУ, Санкт-Петербург, ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *alen.smotrova@yandex.ru*.

Белок p53 – важнейший онкосупрессор человека, транскрипционный фактор, участвующий в регуляции таких процессов, как апоптоз, арест клеточного цикла и клеточное старение. Активация p53 происходит в ответ на воздействие множества стрессовых факторов, в том числе и теплового шока. В норме белок p53 не накапливается в клетке, его содержание поддерживается на низком уровне за счет постоянного направления на протеасомную деградацию специфичными E3-убиквитинлигазами. Однако мутантные формы p53 могут проявлять онкогенные свойства. Появление мутантного p53 в клетках, по клиническим данным, коррелирует с плохим прогнозом: усилением роста опухоли и развитием метастазирования. Мутантная форма p53 R175H способна образовывать с другими белками агрегаты, в которых она не только стабилизирована, но и активна. Для изучения участия в регуляции mutp53 и wtp53 белков теплового шока, исследовались белковые профили клеток, экспрессирующих mutp53 R175H и wtp53 на разных сроках после теплового шока. Эксперименты проводили на линии MDA-MB-231, трансдуцированной лентивирусными векторами, экспрессирующими mutp53 R175H и wtp53, сшитые с зелёным флуоресцентным белком GFP. Тепловой шок проводили в течение 45 минут при 43⁰C. Белковые уровни анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител к p53, Hsp70 и актину в клетках через 0, 1 и 4 часа после теплового шока. Было обнаружено, что уровень Hsp70 в клетках, экспрессирующих mutp53, резко снижается через 1 час после теплового шока и практически полностью восстанавливается через 4 часа. Полученные данные позволяют предположить, что исчезновение белка Hsp70 из клеток с mutp53 через час после теплового шока может быть обусловлено действием убиквитинлигаз, входящих в комплекс с mutp53.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ «ЛИНКЕРНЫХ» БЕЛКОВ ХРОМАТИНА ЭСК МЫШИ. © Т.Ю. Старкова,¹ К.Н. Смирнова,² Т.О. Артамонова,³ А.Н. Томилин.¹ ¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт цитологии российской академии наук, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, ³Санкт-Петербургский государственный политехнический университет имени Петра Великого, Санкт-Петербург, *smirnovaksenia1997@mail.ru*.

На примере одного из ключевых структурно-регуляторных белков хроматина HMGB1 проведено исследование применения метода МАЛДИ масс-спектрометрии для идентификации посттрансляционных модификаций белков. Экстракция негистоновых белков HMGB из ЭСК мыши проводилась хлорной кислотой с последующим осаждением белков подкисленным ацетоном. Разделение белков HMGB семейства осуществлялось с помощью 2D-электрофореза (мочевина/ПААГ). HMGB1-содержащие белковые зоны анализировали с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии. Регистрацию масс-спектров образца проводили на масс-спектрометре Varian 902-MS MALDI в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500-3000 m/z. Обработку полученных масс-спектров осуществляли с использованием программных пакетов ProteinProspector и Mascot (<http://prospector.ucsf.edu>; <http://www.matrixscience.com>).

Было показано наличие дополнительного (по сравнению с NIH/3T3 клетками) сайта ацетилирования HMGB1, выделенного из ЭСК мыши, в области N-конца белка. Согласно литературным данным, экранировка положительного заряда остатков лизина в данной области полипептидной цепи может приводить к изменению характера связывания белковой молекулы с ДНК и, как следствие, оказывать влияние на структурно-функциональную организацию хроматина.

Работа выполнена на базе ФГБУН ИНЦ РАН при финансовой поддержке РФФИ (18-04-01199) с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий «СПбГПУ» на базе ФГАОУ ВО «СПбПУ».

«ЛИНКЕРНЫЕ» БЕЛКИ HMGB1/HMGB2 В ХРОМАТИНЕ ЭСК МЫШИ. © Т.Ю. Старкова,¹ Е.В. Чихиржина,¹ Т.О. Артамонова,³ А.Н. Томилин.^{1,2} ¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, ³Санкт-Петербургский государственный политехнический университет имени Петра Великого, Санкт-Петербург, t.starkova@incras.ru.

Пролиферация и дифференцировка ЭСК, согласно литературным данным, напрямую зависит от уровня экспрессии негистоновых белков хроматина HMGB1 и HMGB2 семейства HMG (от англ. High Mobility Group), их окислительно-восстановительного состояния и, предположительно, модификационного статуса. Цель работы — исследование посттрансляционных модификаций HMGB1/HMGB2 ЭСК и роли данных

белков в изменениях структурно-функциональных параметров хроматина ЭСК в процессе дифференцировки.

С помощью FT(ICR)MS нами выявлены функционально значимые различия в модификационном статусе HMGB1 ЭСК и дифференцированных клеток мыши. В частности, асK/deасK в области N-конца белка и линкера между ДНК-связывающими доменами регулирует способность HMGB1 изгибать ДНК при связывании. Согласно полученным данным, HMGB1 ЭСК теряет возможность изгиба макромолекулы, связываясь с ней преимущественно на концах. Это, вероятно, должно приводить к частичной обратимой потере его функциональности в хроматине ЭСК. CRISPR/Cas9-опосредованный нокаут генов HMGB1 и HMGB2, согласно нашим данным, не приводит к существенным изменениям фенотипа ЭСК мыши. Основные отличия фенотипов HMGB1^{+/+}/HMGB2^{-/-} и HMGB1^{-/-}/HMGB2^{-/-} ЭСК от дикого типа выражаются в снижении скорости пролиферации клеток. Нами показано, что нокаут генов HMGB1/HMGB2 не оказывает влияние и на саму «способность» ЭСК E14 дифференцироваться в EpiLCs клетки, однако наблюдается некоторая задержка дифференцировки по сравнению с ЭСК дикого типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (18-04-01199) и РФФ (14-50-00068) с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий «СПбГПУ» на базе ФГАОУ ВО «СПбПУ».

PIRH2-ОПОСРЕДОВАННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ РНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА HUR. © П.А. Старшова, В.А. Мамонтова, О.А. Федорова, А.В. Петухов, О.Ю. Шувалов, Н.А. Барлев, А.А. Дакс. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *pstrsh@gmail.com*.

Белок Pirh2, продукт гена *RCHY1* человека, обладает убиквитинлигазной активностью и опосредует протеасомную деградацию различных субстратов. Мишенями Pirh2 являются такие белки, как главный онкосупрессор клетки - p53, а также участники регуляции клеточного цикла и апоптоза (p27, p63, Chk2). Ранее нами было показано, что Pirh2 функционально взаимодействует с РНК-связывающим белком Elavl1/HuR, убиквитинирует его и направляет на деградацию. Elavl1/HuR известен как регулятор экспрессии факторов клеточного цикла, апоптоза и опухолевой трансформации, например, p21, c-Мус, циклинов и др.

В данной работе мы использовали 2 клеточные линии с нокдауном Pirh2 (H1299 и HeLa) и выявили Pirh2-опосредованную регуляцию мишеней HuR. Падение уровня Pirh2 способствует увеличению количества HuR, который связывается с 3'-нетранслируемыми областями мРНК, и в зависимости от конкретного гена либо стабилизирует мРНК (в случае с циклином D), либо, наоборот, способствует их деградации (в случае с p27). Так, при тепловом шоке или при обработке ДНК-повреждающим агентом доксорубицином при нок-дауне Pirh2 происходит понижение уровня p27 и повышение уровня циклина D по сравнению с контролем.

Pirh2 и HuR играют противоречивую роль в канцерогенезе и могут быть как онкогенами, так и онкосупрессорами, поэтому более глубокое изучение их взаимодействия может помочь приблизиться к пониманию процесса опухолеобразования. Работа поддержана грантом РФФИ 17-75-10198.

МНОЖЕСТВЕННЫЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОСТОЯНИЯ НА ПУТИ СВОРАЧИВАНИЯ БЛИЖНЕ-ИНФРАКРАСНОГО ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА iRFP713. © *Ольга В. Степаненко,¹ Олеся В. Степаненко.¹* ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, sov@incras.ru.

Ближне-инфракрасные флуоресцентные белки (NIR FPs), сконструированные на основе комплексов бактериальных фитохромов с их природным лигандом, биливердином, нашли применение в качестве генетически-кодируемых оптических проб для прижизненной визуализации молекулярных процессов, происходящих в отдельных клетках и в целом организме с высоким разрешением в реальном масштабе времени. Исследования NIR FPs в основном были направлены на оптимизацию их спектральных и фотофизических свойств, а также выявление особенностей взаимодействия этих белков с их хромофором. Значительно меньше известно о процессах сворачивания NIR FPs.

Ранее при сравнительном изучении процессов денатурации и ренатурации iRFP713, сконструированного на основе бактериального фитохрома RpBphP2, мы показали, что ковалентное связывание биливердина не только стабилизирует структуру iRFP713, но и осложняет процесс фолдинга белка, приводя к накоплению неправильно свернутых агрегированных форм в процессе его рефолдинга. Изучение процессов разворачивания-сворачивания iRFP713, созданного на основе бактериального фитохрома RpBphP2, под действием гуанидингидрохлорида в равновесных условиях не выявило наличия промежуточных состояний. В настоящей работе мы проанализировали как стационарные,

так и кинетические данные, полученные при изучении процессов фолдинга iRFP713 в апо- (в отсутствие хромофора) и холоформе (в комплексе с биливердином), под действием химических денатурирующих агентов различной силы. Анализ спектральных свойств мутантных форм iRFP713, содержащих одиночные триптофановые остатки в PAS и GAF доменах и в области взаимодействия мономеров белка, в присутствии денатурантов позволил судить о структурных изменениях в этих участках белка.

Фолдинг iRFP713 в апо- и холоформе является многоступенчатым процессом, сопровождающимся накоплением двух промежуточных состояний белка. Полная обратимость денатурации iRFP713 в апоформе свидетельствует о том, что схема процесса разворачивания – сворачивания iRFP713 в апоформе отражает путь фолдинга нативной последовательности белка. Промежуточные состояния на пути фолдинга iRFP713 были охарактеризованы как мономерные разрыхленное и компактное состояния. Было показано, что положительно заряженные ионы гуанидина взаимодействуют с iRFP713 в промежуточном разрыхленном состоянии, нейтрализуя поверхностный отрицательный заряд белка, в результате чего наблюдается образование агрегатов белка в этом промежуточном состоянии. Это позволило сделать вывод о том, что агрегированное состояние белка не является промежуточным состоянием на пути фолдинга iRFP713, а образуется в результате взаимодействия белка с ионным денатурирующим агентом. Полученные данные имеют существенное значение для понимания функционирования и практического использования NIR FPs в различных условиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы МКБ РАН и Российского фонда фундаментальных исследований (грант 16-04-01515).

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВЯЗКИХ СРЕД НА СТРУКТУРУ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ. © Л.А. Суковатый,¹ А.А. Деева,¹ Е.В. Немцева.^{1,2} ¹Лаборатория биолюминесцентных биотехнологий Сибирского федерального университета, Красноярск, ²Лаборатория фотобиологии, Институт биофизики СО РАН, Федеральный научно-исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, suk-lev@yandex.ru.

Бактериальная люцифераза представляет собой монооксигеназу, которая катализирует окисление восстановленного флавина и алифатического альдегида с испусканием кванта света. Данный фермент используется в различных прикладных областях, таких как биотестирование и биоиндикация. Однако механизм работы

люциферазы изучен не полностью. Исследования по изучению влияния различных вязких сред на люциферазу показали значительное изменение кинетических свойств фермента. Вязкие среды позволяют моделировать внутриклеточное окружение *in vitro* и исследовать сложные динамические свойства биомакромолекул.

В данном исследовании для моделирования поведения бактериальной люциферазы в явном растворителе использовался метод молекулярной динамики (МД). Целью исследования являлось определение влияния вязкости на структуру бактериальной люциферазы *Vibrio harveyi* (BLuc, PDB ID: 3FGC) с использованием МД подхода. Расчеты проводились при помощи программного пакета молекулярной динамики GROMACS и силового поля CHARMM36. Предварительно было подготовлено девять систем: BLuc в воде, BLuc в 10%, 20%, 30% и 40% растворе глицерина, BLuc в 10%, 20%, 30% и 40% растворе сахарозы. Для каждой системы было проведено вычисление молекулярной динамики длительностью 40 нс. Анализ средней квадратичной флуктуации C_{α} атомов (RMSF) на основе полученных траекторий показал, что в присутствии глицерина и сахарозы происходит уменьшение подвижности, как всего белка в целом, так и участка структуры фермента BLuc, включающего α Tyr10 - α Gly50, по сравнению с подвижностью в воде. Большинство из этих аминокислотных остатков расположено рядом с активным центром или формируют его. В частности, α His44 взаимодействует с промежуточными продуктами реакции. Таким образом, снижение подвижности может непосредственно влиять на каталитическую функцию люциферазы. В целом, увеличение концентрации глицерина и сахарозы не привело к резкому изменению гибкости остова структуры, но наблюдаемые изменения в активном центре люциферазы могут быть функционально важными.

ЧЕМ ОБУСЛОВЛЕНО ИЗМЕНЕНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТИОФЛАВИНА Т ПРИ ЕГО СВЯЗЫВАНИИ С АМИЛОИДНЫМИ ФИБРИЛЛАМИ? © А.И. Сулацкая,¹ Н.П. Родина,^{1,2} М.И. Сулацкий,¹ И.М. Кузнецова,^{1,2} К.К. Туроверов.^{1,2} ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, ansul@mail.ru.

Бензтиазольный краситель тиофлавин Т (ThT) является наиболее известным и широко используемым зондом для диагностики образования амилоидных фибрилл, накопление которых в организме сопутствует ряду тяжелых заболеваний, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона, прионные заболевания и др. Это обусловлено

существенным возрастанием интенсивности флуоресценции красителя при связывании с фибриллами, а также специфичностью этого взаимодействия. Эффективность использования ThT для изучения амилоидных фибрилл в значительной мере зависит от того, насколько корректны представления о фотофизических свойствах красителя и механизме его взаимодействия с фибриллами. Однако на этот счет в литературе существует ряд противоречивых гипотез. В частности, исследователи пытаются доказать, что флуоресценция ThT, связанного с амилоидными фибриллами, обусловлена димерами, эксимерами и мицеллами красителя.

Для того чтобы разобраться в существующих гипотезах и создать единую картину взаимодействия красителя с фибриллами, в первую очередь, были проанализированы представленные в литературе доказательства формирования красителем агрегатов в связанном с фибриллами состоянии. Было сделано заключение о том, что эти предположения основываются на ошибочных представлениях о спектральных свойствах свободного ThT в водном растворе и на некорректной интерпретации характера экспериментальной зависимости интенсивности флуоресценции красителя от его концентрации.

Нами были исследованы фотофизические свойства ThT в водном растворе в широком диапазоне его концентраций, в водно-глицериновых смесях при различной температуре, в присутствии краудиг-агентов и при связывании с амилоидными фибриллами. Нужно отметить, что для определения фотофизических характеристик свободных и связанных с амилоидными фибриллами молекул ThT (которые представляют собой равновесную систему в присутствии фибрилл) был разработан специальный подход для подготовки тестируемых растворов, основанный на применении метода равновесного микродиализа. Анализ спектров флуоресценции ThT в различных условиях (и, в наибольшей степени, его высококонцентрированных растворов) был осложнен существенным влиянием на регистрируемые характеристики эффектов первичного и вторичного внутреннего фильтра, для учета которых также были использованы специально разработанные протоколы.

Сравнительный анализ полученных фотофизических характеристик красителя в различных условиях позволил сделать заключение о мономерной модели связывания ThT с амилоидными фибриллами, а также о том, что причиной изменения его фотофизических характеристик при связывании с фибриллами является молекулярно-ротаторная природа красителя.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 16-04-01614_а и 18-54-00022_Бел и стипендии Президента РФ СП-841.2018.4.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНИЗОТРОПИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ВОЗБУЖДЕННОГО СОСТОЯНИЯ БЕНЗТИАЗОЛЬНОГО КРАСИТЕЛЯ ТИОФЛАВИНА Т В РАСТВОРИТЕЛЯХ РАЗЛИЧНОЙ ВЯЗКОСТИ И ПОЛЯРНОСТИ. © *М.И. Сулацкий,¹ А. И. Сулацкая,¹ Н. П. Родина,^{1,2} И. М. Кузнецова,^{1,2} К. К. Туроверов.^{1,2}* ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, *m_sulatsky@mail.ru*.

Флуоресценция является чувствительным методом для изучения структуры, динамики и функций биологических макромолекул. Поскольку исследование собственной флуоресценции биологических объектов не всегда позволяет получить полную информацию о них, в настоящее время широко используются различные флуорофоры, изменяющие свои фотофизические характеристики при взаимодействии с объектом исследования. Одним из широко и эффективно применяемых зондов, используемых для диагностики образования и исследования структуры амилоидных фибрилл, накопление которых в тканях и органах приводит к возникновению ряда тяжелых заболеваний, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона и др., является бензтиазольный краситель тиофлавин Т (ThT). В ряде недавних работ был предложен новый метод изучения фибриллогенеза, основанный на регистрации кинетики затухания флуоресценции ThT. В связи с этим возникла необходимость проведения комплексного исследования, позволяющего оценить время затухания и анизотропию флуоресценции несвязанных с фибриллами молекул ThT и понять причины изменения этих характеристик при взаимодействии красителя с фибриллами.

В настоящей работе с использованием кривых затухания флуоресценции ThT, зарегистрированных в широком диапазоне длин волн, была проведена оценка времени затухания и анизотропии флуоресценции красителя в различных условиях. Сделано заключение о том, что влияние растворителя на константу скорости безызлучательной дезактивации возбужденного состояния красителя определяется как его вязкостью, так и полярностью растворителя. Полученные результаты позволили сделать предположение о решающей роли торсионной релаксации в тушении флуоресценции ThT в маловязких растворителях.

Кроме того, было проведено исследование кинетики затухания флуоресценции и определены фотофизические характеристики ThT, связанного с амилоидными фибриллами. Показано, что анизотропия флуоресценции красителя, встроенного в

амилоидные фибриллы на основе различных белков, остается предельно высокой и практически не отличается от анизотропии флуоресценции ThT в водных растворах. При этом время затухания флуоресценции ThT, связанного с фибриллами на основе инсулина и лизоцима, различно и на несколько порядков превышает время жизни флуоресценции красителя в водных растворах. На основании полученных результатов сделано заключение о том, что определение такого параметра, как время жизни возбужденного состояния ThT (но не анизотропия флуоресценции красителя, как предполагается в ряде работ), может стать новым чувствительным подходом к исследованию кинетики образования амилоидных фибрилл и их полиморфизма.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 16-04-01614_а и 18-54-00022_Бел и стипендии Президента РФ СП-841.2018.4.

ВЛИЯНИЕ ВЯЗКОСТИ РЕАКЦИОННОЙ СРЕДЫ НА КИНЕТИЧЕСКИЕ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СИСТЕМ. © О.С. Сутормин,¹ И.Е. Суковатая,¹ В.А. Кратасюк.^{1,2}

¹Кафедра биофизики Сибирского федерального университета, Красноярск, ²Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», osutormin@sfu-kras.ru.

Одним из современных трендов в области биохимии и биотехнологии является моделирование внутриклеточных условий в пробирке с использованием различных веществ, моделирующих по физико-химическим свойствам реальное внутриклеточное окружение. Наиболее распространёнными моделирующими веществами являются органические растворители и краудинг агенты. При этом, как отмечают некоторые авторы, необходимо исследовать не только как среды различной вязкости и скученности влияют на скорость ферментативных реакций, но также акцентировать внимание на вязкостно-температурные характеристики ферментативных реакций. В этой работе проведено исследование влияния вязкости реакционной среды и температуры на кинетические характеристики бактериальной люциферазы сопряженной с НАД(Ф)Н-ФМН-оксидоредуктаза (Р + Л) и лактатдегидрогеназа + НАД(Ф)Н-ФМН-оксидоредуктаза (ЛДГ + Р + Л). Сопряжение бактериальной люциферазы проводилось исходя из соображений, что большинство ферментативных реакций в клетках протекают в виде

мультиферментных реакций и комплексов. Р + Л и ЛДГ + Р + Л ферментативные биолюминесцентные системы по-разному чувствительны к вязкости реакционной среды. Изменение параметров биолюминесцентной реакции – константа спада и квантовый выход, зависит не только от вязкости реакционной среды, но и от природы моделирующего растворителя. Отдельно хочется отметить, что повышение вязкости реакционной среды позитивно сказывается на каталитической активности Р + Л ферментативной системы. Так, в присутствии 40% сахарозы и 50% глицерина происходит сдвиг температурного оптимума Р + Л системы на 10°C. Рассчитанные значения энергии активации для двух ферментативных систем показали, что сахароза наибольшим образом влияет на изменение энергетического профиля реакции. Использование глицерина, в качестве моделирующего агента, больше сказывается на изменении диффузионных процессов ферментативной реакции, чем на изменении подвижности каталитически важных фрагментов бактериальной люциферазы. Работы выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда проект № 16-14-10115.

ВЗАИМНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СУБЪЕДИНИЦ РВАФ ХРОМАТИН-РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА И СМУС © Е.В. Татарский, А.А. Шейнов, С.Г. Георгиева, Н.В. Сошникова, Институт биологии гена РАН, Москва, ghetat@gmail.com.

Хроматин-ремоделирующие комплексы семейства РВАФ отвечают за изменение структуры хроматина и, таким образом, контролируют экспрессию генов. Особенно важную роль комплексы РВАФ играют при развитии организма. Нарушения в работе ремоделирующего комплекса РВАФ, приводят к различным заболеваниям, многие из которых влияют на когнитивные функции. Мутации в субъединицах РВАФ комплекса распространены при развитии рака. Субъединицы комплекса взаимодействуют с многими активаторами транскрипции и регулируют гены пролиферации и дифференцировки.

с-Мус - один из генов раннего ответа (Immediate early genes - IEG), кодирующий белок, являющийся мощным активатором транскрипции генов. с сМус -зависимые гены важны для прогрессии клеточного цикла, апоптоза и клеточной трансформации. с сМус часто имеет повышенную экспрессию при нарушениях клеточных механизмов, ведущих к злокачественным трансформациям. Индукция генов раннего ответа, в том числе и с сМус, происходит чрезвычайно быстро как при внешних воздействиях на клетку, так и под влиянием некоторых внутренних стимулов.

Нами было показано, что сМус взаимодействует с РВАФ комплексом, в частности с субъединицей РНФ10. Эта субъединица представлена в клетке в виде четырех изоформ,

которые альтернативно включаясь в состав РВАФ комплекса, влияют на его взаимодействие с хроматином. Также сМус способен сам активировать ген РНФ10 - при гиперэкспрессии сМус в первичных фибробластах человека мы наблюдали увеличение экспрессии РНФ10 изоформ. И наоборот, при нокдауне РНФ10 мы детектировали уменьшение уровня мРНК сМус.

Таким образом, между субъединицей РНФ10 и сМус существует тесная взаимная регуляция на транскрипционном уровне и на уровне взаимодействия белков. Мы предполагаем, что РВАФ комплекс, включающий в свой состав РНФ10, может являться коактиватором сМус и моделировать экспрессию сМус-зависимых генов.

Данная работа поддержана грантом РФФИ 17-54-33031 "Ингибирование взаимодействий между онкогеном МYC и факторами, ремоделирующими хроматин, как новая стратегия в лечении меланомы"

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ UDTRF2 ДОМЕНА ТЕЛОМЕР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА TRF2 С БЕЛКАМИ ЯДЕРНОЙ ЛАМИНЫ. *А.О. Травина,¹ Н.В.Ильичева.²* ¹ Санкт-Петербургский государственный технологический институт, ²Институт цитологии РАН

В состав теломер-связывающего белка TRF2 входит домен udTRF2, функции которого неясны. Гомология между этим доменом и участками rod-доменов нейрофиламентов и ламинов может говорить о роли домена во взаимодействии TRF2 с ядерной мембраной. Исследование механизмов взаимодействия теломер с ядерной мембраной необходимо для понимания процессов естественного клеточного старения и некоторых молекулярных аспектов развития прогерии. Полипептид, соответствующий домену TRF2 с неизвестными функциями, был получен с помощью бактериального штамма-продуцента *E. Coli* RosettaBlue (DE3)-pET32a-udTRF2 и выделен из растворимой фракции клеточного лизата методами высаливания сульфатом аммония и ионообменной хроматографии. К домену получены поликлональные антитела путем иммунизации морских свинок. Ядра клеток печени мышей выделяли с помощью дифференциального центрифугирования в 2,1 М сахарозе. Ядерную ламину выделяли из очищенных ядер как описано в [1]. Антитела к udTRF2 инкубировали с протеин А-сефарозой 3 часа при +4°C. Экстракт ядерной ламины инкубировали с udTRF2 в течение 7 часов при +4°C, добавляли к протеину А-сефарозе с антителами, инкубировали 14 ч при +4°C (проба 1). В качестве контроля протеин А-сефарозу с антителами инкубировали с экстрактом ламины (проба 2)

и с раствором udTRF2 (проба 3). Проводили иммуноблоттинг с антителами к TRF2 (antiTRF2, Abcam), к ламинам С и В. В контрольной пробе 3 udTRF2 связался с сефарозой, в то время как в пробе 1 остался в растворе, ламины в пробах 1 и 2 так же находятся в растворе. Потеря способности udTRF2 связываться с антителами в присутствии экстракта ламины может свидетельствовать о прямом взаимодействии этого домена с ядерной ламиной. Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта РНФ (№15-15-20026)

1. Kaufman, S.H., Coffey, D.S., Shaper, J.H. (1981) Consideration in the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear matrix, nuclear envelope and pore complex lamina. *Exp.Cell Res.*, 132, 105-23

ВЫЯВЛЕНИЕ ТКАНЕВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ АНТИТЕЛ ПРОТИВ БЕЛКА Р48 ИЗ МОДУЛЯРНЫХ КЛЕТОК *STYELA RUSTICA* (LINNAEUS, 1767) У НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ БЕЛОМОРСКИХ АСЦИДИЙ. © М.И. Тылец,¹ М.А. Даугавет,² Т.Г. Шапошникова.¹ ¹Биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *masana97@yandex.ru*.

Оболочники (Tunicata) являются интересной с точки зрения эволюции группой, находясь у основания ветви Хордовых. Однако, Оболочникам присущи необычные для Хордовых черты организации, такие как наличие хорды и нервной трубки только на личиночной стадии; покровы, образованные целлюлозной туникой; переход многих представителей этого подтипа к сидячему образу жизни (Вестхаиде, Ригер, 2008). Сравнение сиквенированного генома аппендикулярии *Oikopleura dioica* и геномов других хордовых показало, что именно Оболочники, а не Головохордовые, как считалось ранее, являются ближайшей предковой группой позвоночных животных (Delsuc et al., 2006). Асцидии, самый большой класс Оболочников, его представители населяют морские бентосные сообщества. Объектами нашего исследования стали асцидии Белого моря.

В крови асцидий описывают от 5 до 12 типов клеток. Модулярные клетки составляют 30-40% от общей популяции всех клеток крови (Чага, 1998). В предыдущей работе было показано, что у асцидии *Styela rustica* данный тип клеток содержит два мажорных белка, одним из которых является белок р48 (Подгорная, Шапошникова, 1998). Были получены новые поликлональные антитела против белка р48 из модулярных клеток асцидии *Styela rustica*. Целью данной работы стало определение их специфичности.

Тканевая специфичность была протестирована на срезах асцидий *Styela rustica* и *Styela coriacea* (сем. Styelidae), *Molgula citrina* (сем. Molgulidae), *Boltenia echinata* (сем. Pyuridae) с помощью метода непрямой иммуногистохимии. Для морфологических наблюдений и выявления морулярных клеток проводили окрашивание гематоксилином и эозином.

На препаратах фракций клеток крови асцидии *Styela rustica*, разделенных в плотностном градиенте Перколла, было показано избирательное взаимодействие антител с морулярными клетками крови. Это позволило показать связывание антител с морулярными клетками в компонентах незамкнутой кровеносной системы асцидий и на внутренней границе туники. У всех исследованных видов асцидий антитела к белку р48 специфически окрашивают материал туники и окружающие ооцит тестальные клетки. Согласно некоторым данным, функциональной ролью тестальных клеток может быть участие в образовании туники личинки (Okada et al. ,1996). Полученные результаты подтверждают гипотезу об участии белка р48, синтезируемого морулярными клетками крови, в образовании внеклеточного матрикса туники.

На видах *Styela rustica* и *Boltenia echinata* обнаружено связывание антител против белка р48 клетками 2-й и 4-й зон эндостия. У *Boltenia echinata* окрашиваются так же клетки кишечного эпителия. Природа антигенных детерминант, присутствующих в клетках эндостия и кишечного эпителия, пока не ясна. Возможно, белок р48 не только участвует в образовании туники, но и выполняет иную функцию в пищеварительной системе асцидий.

Результаты проделанной работы позволяют продолжить изучение формирования туники асцидий, а также выяснение функциональной роли клеток эндостия и кишечного эпителия.

ПАРАМЕТРЫ СПЕРМОГРАММЫ МЫШЕЙ ПОСЛЕ 30-СУТОЧНОГО АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОГО ВЫВЕШИВАНИЯ И ПОСЛЕДУЮЩЕГО 12-ЧАСОВОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ. © М.А. Усик,^{1,2} С.С. Локтев,¹ И.В. Огнева.^{1,2} ¹ГНЦ РФ – ИМБП РАН, Москва, ²Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, usik.maria@mail.ru.

Данные об изменениях в мужских половых клетках в условиях гравитационной разгрузки очень немногочисленны, поэтому целью данной работы являлась оценка параметров спермограммы мышей линии C57Black6/J, находившихся в условиях, моделирующих эффекты микрогравитации в течение 30 суток – группа 30HS (n=7),

последующего 12-часового восстановления – группа 30HS+12h (n=7) и соответствующей контрольной группы С (n=7), а также мышей, получавших перорально эссенциальные фосфолипиды в дозировке 500 мг/кг/сутки – группы 30HSE (n=7), 30HSE+12h (n=7) и СЕ (n=7) соответственно. Количество сперматозоидов в группе 30HS снижалось на 45%, а в группе 30HS+12h на 51% ($p<0,05$) по сравнению с группой контроля. Более того, доля подвижных сперматозоидов в этих группах снижалась более чем в 5 раз по сравнению с контролем. Применение эссенциальных фосфолипидов приводило к тому, что в группе СЕ число зрелых форм было увеличено на 34% по сравнению с группой С ($p<0,05$). Однако на фоне применения эссенциальных фосфолипидов антиорто статическое вывешивание, так же как и последующее 12-часовое восстановление не приводило к уменьшению числа зрелых форм. Хотя, следует отметить, что в группе 30HSE снижение доли подвижных сперматозоидов было аналогичным группе 30HS. Тем не менее, параметры спермограммы в группе 30HSE+12h не отличались от таковых в контрольной группе. Во всех исследованных группах значения доли жизнеспособных сперматозоидов, оцененных с помощью окраски эозином, и сперматозоидов с нормальной морфологией, согласно окраске Diff-Quick, коррелировали с числом подвижных сперматозоидов. Таким образом, параметры спермограммы свидетельствует о снижении числа зрелых форм сперматозоидов после вывешивания, которое предотвращалось применением эссенциальных фосфолипидов. Работа поддержана программой фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН и программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ФОЛДИНГ НЕУПОРЯДОЧЕННОГО ТРАНС-АКТИВАЦИОННОГО ДОМЕНА ОНКОБЕЛКА E2A-RVX1 ПРИ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИИ С KIX ДОМЕНОМ СВР.

© А.В. Фонин,¹ Н. Шарма,² С.А. Силонов,¹ О.Г. Шпиринок¹, К.К. Туроверов,¹ В.Н. Уверский³ Р. Гири,² И.М. Кузнецова.¹ ¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ²Индийский технологический институт Манди, Манди, Химачал-Прадеш, Индия, ³Университет Флориды, Тампа, США, alexfonin@incras.ru.

Внутренне неупорядоченные белки (ID белки), неспособные организовать компактную упорядоченную структуру за счет самоорганизации, могут образовывать компактную структуру при взаимодействии с партнерами, если свободная энергия возникающего комплекса меньше свободной энергии белка и партнера до

взаимодействия. Известно, что при комплексообразовании KIX домена транскрипционного коактиватора CBP со своими партнерами, являющимися ID белками, наблюдается компактизация их структуры. В настоящей работе исследовано взаимодействие KIX домена CBP с неупорядоченным транс-активационным доменом (TAD) онкобелка E2A-PBX1. Известно, что взаимодействие активационного домена AD1 E2A-PBX1 с KIX доменом CBP способствует immortalization первичных гемопоэтических клеток. KIX непосредственно связывается с так называемой PCET последовательностью активационного домена AD1 E2A-PBX1, состоящей из 2 консервативных последовательностей Leu-x-x-Leu-Leu и Leu-Asp-Phe-Ser, встречающихся у белков, взаимодействующих с активаторами транскрипции. TAD в водных растворах представляет собой неупорядоченный пептид, практически не содержащий упорядоченных участков. При этом анализ первичной структуры TAD свидетельствует о высокой вероятности образования альфа-спиральной структуры PCET-мотивом TAD, а доля альфа-спиральных участков в структуре TAD в комплексе с KIX составляет 20 – 30 %. Для того, чтобы определить причины, вызывающие упорядочивание структуры TAD, нами была исследована структура этого домена в различных растворителях. Установлено, что изменение pH, ионной силы раствора, условий макромолекулярного краудинга, создаваемого высококонцентрированными растворами полиэтиленгликоля (PEG), а также присутствие осмолитов (саркозина, таурина) не вызывает компактизацию структуры TAD. В то же время существенное упорядочивание структуры TAD было зарегистрировано в растворах ТМАО и в растворах спиртов: 2,2,2 – трифторэтанол (TFE), этанола, гексаизофторпропанола (HFIP). Полученные данные позволили заключить, что упорядочивание TAD обусловлено его дегидратацией. Соответственно, мы предположили, что приобретение TAD альфа-спиральной структуры при связывании с KIX обусловлено вытеснением воды из ближайшего окружения PCET-мотива TAD. Для проверки этой гипотезы была исследована структура мутантной формы TAD с заменой L20P в различных растворителях. Известно, что эта замена ослабляет взаимодействие E2A-PBX1 с KIX доменом и индукцию лейкоза костного мозга мышей *in vitro*. Показано, что структура мутантной формы TAD/L20P практически не изменяется в растворах спиртов и ТМАО. Эти данные подтвердили наше предположение об упорядочивании TAD при взаимодействии с KIX вследствие дегидратации PCET-мотива TAD.

Работа выполнена при поддержке РФФИ грант № 17-54-45169 ИНД (ИМК) и INT/RUS/RFBR/P-255 (Р.Г.).

ВОЗМОЖНЫЕ ИСТОЧНИКИ КЛЕТОЧНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ
ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ИСКУССТВЕННОЙ РОГОВИЦЫ. ©
*Ю.И. Хорольская,¹ О.И. Александрова,¹ В.В. Карпович,² Г.А. Писугина,³ К.Э. Журенков,³
Д.А. Переплетчикова,⁴ Т.В. Машель,⁴ М.И. Блинова.¹* ¹Институт цитологии РАН, Санкт-
Петербург, ²Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, ³Санкт-
Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, ⁴Санкт-Петербургский
политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург,
juliya_khorolskaya@mail.ru.

При различных повреждениях и патологиях переднего отрезка глазного яблока часто развивается синдром лимбальной недостаточности, возникающий в результате дисфункции, повреждения или гибели лимбальных стволовых клеток (ЛСК), которые обеспечивают обновление клеток роговицы глаза. Существуют различные подходы для лечения синдрома лимбальной недостаточности и восстановления целостности роговицы. Не всегда удается добиться восстановления поврежденных тканей при помощи традиционных методов, особенно в двусторонних случаях, поэтому встает вопрос о разработке клеточных продуктов, способных компенсировать потерю функциональности ЛСК и направленных на восстановление целостности роговицы.

В связи с дефицитом донорского материала, необходимого для восстановления функциональности лимба и роговицы, рассматриваются различные источники клеточного компонента для создания тканеинженерных конструкций. Одним из наиболее подходящих источников представляются ЛСК, однако трудоемкость получения и острая нехватка донорского материала накладывают ограничения на их применение в регенеративной медицине. Альтернативными вариантами могут выступать мезенхимальные стволовые клетки различных тканей, фибробласты и кератиноциты кожи, а также клетки буккального (защечного) эпителия. Использование данных клеточных типов открывает возможности применения аутологичного клеточного материала, исключая риск заражения и отторжения тканеинженерного продукта.

В настоящей работе мы охарактеризовали по основным стволовым маркерам и маркерам дифференцировки популяции лимбальных стволовых клеток, мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, фибробластов и кератиноцитов кожи, а также буккального (защечного) эпителия человека и сравнили с постоянной клеточной линией роговицы человека. Данное исследование направлено на поиск оптимального источника клеток, необходимых для восстановления роговицы и возобновления пула ЛСК при синдроме лимбальной недостаточности.

УЧАСТИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО БЕЛКА OMPX В АДГЕЗИИ БАКТЕРИЙ. ©
О.А. Цаплина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, olga566@mail.ru.

Бактерии рода *Serratia* часто являются источником внутрибольничных инфекций. Ранее мы показали, что бактерии *S. proteamaculans* 94 способны проникать в клетки эукариот. Эта способность коррелирует с синтезом в бактериях актин-специфической протеазы протеализин. Однако ни механизм вирулентности этих бактерий, ни роль протеализина не известны. Микроорганизмы могут вызывать инфекцию, попадая внутрь клеток хозяина, для этого необходимо взаимодействие бактериального и клеточного рецепторов.

По данным масс-спектрометрии, субстратом протеализина может быть белок внешней мембраны бактерий OmpX. OmpX является гомологом белка Rck, активного участника адгезии бактерий *Salmonella* к поверхности клеток хозяина. В *Salmonella* экспрессию гена Rck регулирует система Quorum Sensing (QS), отвечающая за индукцию определенного набора генов в ответ на повышение плотности популяции. Мы показали, что инактивация гена синтазы SprI, основного участника системы QS *S. proteamaculans* (штамм любезно предоставлен сотрудниками лаборатории И.А.Хмель, ИМГ РАН), приводит к увеличению экспрессии гена OmpX в 2 раза. При этом происходит увеличение в 2 раза адгезии и инвазивной активности этих бактерий. Следующей задачей работы было определить, может ли белок OmpX участвовать в инвазии бактерий *S. proteamaculans*. Чтобы это проверить, были получены *E.coli*, синтезирующие белок OmpX бактерий *S. proteamaculans*. Показано, что трансформация бактерий *E.coli* плазмидой, несущей ген OmpX, приводит к тому, что бактерии перестают расти при 37 °C и хорошо растут при 30 °C, что характерно для *S. proteamaculans*. Трансформация бактерий *E.coli* плазмидой, несущей ген OmpX, увеличивает адгезию бактерий *E.coli* к поверхности дермальных фибробластов человека DF-2. Используя генно-инженерный белок, мы подтвердили, что OmpX является субстратом протеализина. Таким образом, белок внешней мембраны бактерий *S. proteamaculans* OmpX может вызывать увеличение адгезии и, возможно, инвазии бактерий, а протеализин может быть регулятором этого процесса.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-74-10045.

СРАВНЕНИЕ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ. © А.В. Чубарь,¹ Н.Ю. Семенова,² И.И. Кострома,² В.И. Ругаль,² С.С. Грицаев,² С.С. Бессмельцев,² А.В. Котова,¹ Т.Л. Золина,³ Л.В. Елсукова,³ И.И. Масленникова,^{3,4} Н.В. Пономарцев,¹ Н.И. Енукашвили.¹
¹ФГБУ «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, ² ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург, ³ООО "Покровский Банк стволовых клеток", Санкт-Петербург, ⁴ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, *annachubar95@gmail.com*.

Множественная миелома (ММ) – злокачественное заболевание системы кроветворения. Известно, что при формировании других видов опухолей большую роль играет опухолевое микроокружение, представленное клетками эндотелия, мезенхимными стволовыми клетками (МСК), остеоцитами, адипоцитами и т.д. МСК приобретают опухоль-ассоциированный фенотип. В опухолях костного мозга характер изменений в клетках микроокружения малоизучен. Полное излечение ММ остаётся невозможным, в том числе из-за гетерогенности микроокружения и его влияния на развитие рецидивов и резистентных форм. Изучение микроокружения ММ необходимо для разработки лечения, направленного не только на опухолевые клетки, но и на их окружение.

Цель работы: сравнить свойства МСК костного мозга пациентов с множественной миеломой (ММ) и здоровых доноров. Для МСК, выделенных из материала стеральной пункции 5 пациентов с ММ (после проведенной терапии разными курсами, а также аутоТГСК), оценивали пролиферативную активность, иммунофенотип, способность к остеогенной дифференцировке, наличие в клетках гладкомышечного актина и β -галактозидазы. В качестве маркера старения также оценивали уровень транскрипции сателлита 3 хромосомы 1. В МСК костного мозга больных ММ по сравнению с донорами показано снижение скорости пролиферации, общего времени пассирования с 7 до 5 пассажей, увеличение экспрессии маркеров, ассоциированных со старением. Для МСК костного мозга больных характерно повышение экспрессии сателлита 3. Таким образом, культуры МСК пациентов с ММ после лечения сохраняют опухоль-ассоциированный фенотип. Работа поддержана Грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых №МК-6706.2018.7., Российским научным фондом (грант 15-15-20026).

РЕГУЛЯЦИЯ МЕМБРАННОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИЕНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ
МАЛЫМИ АМФИФИЛЬНЫМИ МОЛЕКУЛАМИ. © *Е.Г. Чулков, С.С. Ефимова,
О.С. Остроумова*. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, echulkov@incras.ru.

Полиеновые антибиотики играют важную роль в лечении грибковых заболеваний человека. Однако их высокая антимикотическая активность сопряжена с выраженной токсичностью для организма человека. Несмотря на десятилетия активных исследований, задача повышения эффективности полиенов остаётся актуальной. Известно, что полиены способны встраиваться в клеточную мембрану патогенного микроорганизма и формировать в ней ион-проницаемые олигомерные липид-полиеновые поры. Строение и механизмы регуляции подобных экзогенных каналов до сих пор не до конца ясны. Важную роль в активности полиенов играют физико-химические свойства мембраны, в том числе наличие стеринного компонента и профиль латерального давления (Kleinberg and Finkelstein, 1984; Bolard, 1986). В работе показана возможность регуляции каналообразующей активности полиеновых антибиотиков малыми амфифильными молекулами различной природы. Способность малых амфифилов взаимодействовать с мембраной определялась по изменению параметров термограмм, способности разрушать большие однослойные липосомы и дезинтергрировать упорядоченные липидные домены в гигантских однослойных везикулах. Обнаружено, что некоторые флавоноиды растительного происхождения (например, флоретин и мирицетин) и местные анестетики (тетракаин и бупивакаин) способны увеличивать трансмембранный электрический ток, индуцированный односторонней добавкой полиена. Увеличение проводимости бислоя, индуцированной полиеном, коррелирует со способностью соединений встраиваться в область гидрофильных головок фосфолипидов и увеличивать латеральное давление в этой области. В совокупности полученные данные позволяют предположить, что тестируемые соединения облегчают формирование липидного устья полиен-липидной поры и снижает энергетическую стоимость формирования проводящей единицы. Полученные результаты могут быть использованы в медицинской нанобиотехнологии при разработке более эффективных способов применения полиеновых антибиотиков. Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект No 14-14-00565).

УБИКВИТИН-ЛИГАЗА MDM2 НЕГАТИВНО РЕГУЛИРУЕТ ФЕРМЕНТЫ ГЛИКОЛИЗА.

© А.И. Шакирова, О.Ю. Шувалов, А.В. Петухов, О.А. Фёдорова, А.А. Дакс, Е.А. Васильева, Н.А. Барлев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, shaigul93@mail.ru.

Измененный метаболизм является одной из основных характеристик раковых клеток. При этом повышенный уровень гликолиза считается яркой чертой раково-ассоциированного метаболизма. Хорошо известно, что оверэкспрессия его ферментов ассоциирована с устойчивостью злокачественных новообразований к химиотерапии, а также с неблагоприятным прогнозом выживаемости для пациентов. Регуляцию метаболических процессов, происходящих в раковых клетках, осуществляет ряд хорошо охарактеризованных белков, таких как HIF1 альфа, cMyc и p53. Mdm2 является главной E3-убиквитинлигазой важнейшего онкосупрессора человека p53. Помимо этого, он также участвует в различных клеточных процессах и в настоящее время рассматривается в качестве перспективной мишени онкофармакологии. При этом, в зависимости от клеточного контекста, Mdm2 могут быть присущи как онкогенные, так и онкосупрессорные свойства. Для успешного применения ингибиторов Mdm2 важно как можно глубже понимать структурно-функциональную роль Mdm2 в раковых клетках различного генезиса.

Ранее сотрудниками нашей лаборатории были получены данные масс-спектрометрической идентификации интерактантов Mdm2. Среди данных интерактантов был идентифицирован ряд ферментов гликолиза. Поэтому целью данного исследования стало изучение влияния Mdm2 на ферменты гликолиза.

В ходе выполненной работы нами было верифицировано физическое взаимодействие Mdm2 с некоторыми ферментами гликолиза (AldoA, PGK1, GAPDH, LDHA) методами *gst-pull down* на клеточных линиях MCF7 и HEK293T и коиммунопреципитации на клеточной линии HEK293T.

Кроме того, на клеточных линиях MDA-MB-231 (рак молочной железы) и H1299 (легочная карцинома) изучалось влияние нокдауна и оверэкспрессии Mdm2 на ферменты гликолиза. Методом Real-time PCR показано, что оверэкспрессия Mdm2 не влияет на количество мРНК ферментов гликолиза. При этом с использованием иммуноблоттинга показано, что при оверэкспрессии Mdm2 количество ферментов гликолиза на белковом уровне снижается, а при нокдауне Mdm2, соответственно, повышается.

В совокупности, полученные нами данные свидетельствуют об угнетающем влиянии Mdm2 на гликолиз в раковых клетках, что может быть связано с его убиквитин-

лигазной активностью по отношению к ферментам гликолиза и последующей деградацией данных белков.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №17-75-10205.

РНF10 — СУБЪЕДИНИЦА РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА PBAF РЕГУЛИРУЕТСЯ КИНАЗАМИ FGF-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ © А.А. Шейнов, Е.В. Татарский, С.Г. Георгиева, Н.В. Сошникова. Институт биологии гена РАН, Москва, asheinov@gmail.com.

Ремоделирующие комплексы играют важную роль в регуляции экспрессии генов при развитии организма и в реализации различных генетических программ. Ремоделирующие комплексы PBAF, одного из семейств SWI/SNF, изменяют структуру хроматина, обеспечивая доступ транскрипционным факторам к регуляторным последовательностям генов. Регуляция работы ремоделирующих комплексов осуществляется во многом за счет изменения субъединичного состава в процессе развития организма. Также субъединицы комплекса PBAF подвергаются посттрансляционным модификациям, которые влияют на функции всего комплекса. Многие субъединицы комплекса фосфорилируются киназами FGF/EGF сигнального каскада, играющего важную роль в процессе эмбриогенеза. Например, BAF155 и BAF47 фосфорилируются Akt1 киназой, Baf60c фосфорилируется MAP киназой p38, АТФаза Brg1 фосфорилируется PKC β 1.

Одной из важных субъединиц PBAF комплекса является белок РНF10, определяющий взаимодействие PBAF комплекса с хроматином. РНF10 представлен в клетке четырьмя изоформами. Изоформы альтернативно включаются в PBAF комплекс и по-разному влияют на ремоделируемые комплексом гены. Мы показали, что все изоформы РНF10 значительно фосфорилированы. Каждая изоформа имеет уникальный паттерн фосфорилирования, зависящий от доменной структуры. В данной работе мы изучили паттерн фосфорилирования Y, характерный для изоформ РНF10 имеющих длинный N-концевой домен. Было показано, что множественное фосфорилирование Y-кластера определяется двумя ключевыми серинами и является триггерным. Данные серины входят в состав мотивов, узнающихся Akt и ERK1/2 киназами FGF/EGF сигнального каскада. При мутации этих серинов происходит полное элиминирование множественного фосфорилирования Y-кластера. Нами была выявлена минимальная последовательность РНF10, подвергающаяся фосфорилированию, и показано, что в состав

комплекса PBAF включаются максимально фосфорилированные изоформы RNF10. Таким образом, можно предположить, что фосфорилирование Y-кластера длинных изоформ RNF10 киназами Akt и ERK1/2 влияет на функционирование комплекса PBAF и регулирует его участие в активации генов в ответ на действие белков FGF/EGF сигнального каскада.

Данная работа поддержана грантом РФФИ 18-04-00885 А “Влияние фосфорилирования на регуляцию RNF10/BAF45a — субъединицы ремоделирующего хроматин комплекса PBAF млекопитающих”

ЭФФЕКТ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ И ТЕПЛОВОГО ШОКА НА ГЕНЕТИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ. © М.А. Шилина, З.В. Ковалева, Т.М. Гринчук. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *shili-mariya@yandex.ru*.

Целью настоящего исследования был сравнительный цитогенетический анализ эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека (ЭМСК) *in vitro* после воздействия различных типов экзогенного стресса - сублетальной дозы рентгеновского облучения (5 Гр) и сублетального теплового шока (45 ° С в течение 30 минут). Для хромосомного анализа мы использовали метод G-бэндинга. Было обнаружено, что оба типа стресса вызвали изменения в структуре кариотипа ЭМСК. В обоих случаях более 80% анализируемых клеток имели кариотипические аномалии. Основными типами хромосомных перестроек были анеуплоидия и хромосомные поломки. Хромосомы 1 и 4 вовлекались в поломки чаще, чем другие хромосомы, как после теплового шока, так и после облучения. Количество хромосом, участвующих в перестройках в результате теплового шока, было больше, чем после рентгеновского облучения. В обоих случаях хромосомные разрывы были обнаружены в центромерных и дистальных локусах. В целом дестабилизация кариотипа в стволовых клетках, подвергнутых тепловому шоку и рентгеновскому облучению, была аналогичной. Такие изменения в кариотипе типичны для клеток с нарушенной программой клеточного деления. Анализ SA-β-gal показал, что клетки как после теплового шока, так и после рентгеновского облучения вступают в фазу репликативного старения, что говорит об отсутствии в них иммортализации / трансформации.

Работа была поддержана Российским научным фондом (проект 14-5000068).

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ УРЕТРОПЛАСТИКИ. © *А.В. Шишова,^{1,2} Ю.А. Нащекина,¹ М.И. Блинова,¹ А.М. Горелова,³ А.Н. Муравьев,³ Т.И. Виноградова,³ Н.М. Юдинцева.¹* ¹Институт цитологии РАН, ²Санкт-Петербургский государственный университет, ³Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии, Минздрава Российской Федерации, Санкт-Петербург, *agaropektin@yandex.ru*.

Заместительная уретропластика – это операция, которая направлена на восстановление структуры и функции мочеиспускательного канала, путем увеличения его просвета за счет применения лоскутов и трансплантатов различной природы. В настоящее время золотым стандартом является буккальная уретропластика, при которой в качестве заместительного материала используется слизистая оболочка внутренней поверхности щеки. Несмотря на распространённость, данный подход имеет свои ограничения, поэтому задачей тканевой инженерии является поиск материала для трансплантации.

Целью работы являлась оценка перспективы применения тканеинженерной конструкции (ТИК), на основе двухслойного скаффолда, заселенного мезенхимальными стромальными клетками (МСК), в качестве замещающего материала при заместительной уретропластике.

Материалы и методы: для приготовления двухслойного скаффолда использовали полилактид (полимер молочной кислоты – поли D, L-лактид) – пористый слой, и поли (ε-капролактон) – водонепроницаемый слой. На пористую поверхность скаффолда вносили МСК костного мозга кролика. ТИК использовали при уретропластике дорзальной стенки уретры. Кроликам контрольной группы проводили аутологичную буккальную пластику. Контроль за зоной имплантации проводили с помощью уретрографии.

Результаты и выводы: Полученные нами предварительные данные показали, что использование ТИК, заселенной МСК, способствовало восстановлению дефектов уретры и уменьшало вероятность образования стриктур и рубцов в долгосрочной перспективе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта РФФИ № 14-50-00068.

УБИКВИТИН-ЛИГАЗА MDM2 КОНТРОЛИРУЕТ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НЕЗАВИСИМО ОТ P53 © *О.Ю. Шувалов, А.И. Шакирова, А.В. Петухов, А.И. Кизенко, О.А. Фёдорова, А.А. Дакс, Е.А. Васильева, Н.А. Барлев.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *oleg8988@mail.ru*.

Раковые клетки различного генезиса характеризуются специфическими изменениями в метаболизме, основным из которых интенсификация гликолиза даже при аэробных условиях («эффект Варбурга»). В настоящее время регуляторы и ключевые ферменты онко-ассоциированного метаболизма рассматриваются в качестве перспективных мишеней онкофармакологии.

В рамках данной работы мы использовали протеомный подход для идентификации белков, взаимодействующих с убиквитин-лигазой MDM2. Среди идентифицированных интерактантов MDM2 в числе прочих ферментов онко-ассоциированного метаболизма нами были выявлены ферменты гликолиза – ALDOA, GAPDH, PGK1, PFKM и LDHA. Мы подтвердили физическое взаимодействие MDM2 с этими ферментами и показали их MDM2–зависимую негативную регуляцию. Кроме того, с использованием р53-негативных клеточных моделей РМЖ и аденокарциномы легкого мы показали, что MDM2 негативно регулирует гликолиз и дыхание, способствуя, таким образом, снижению энергетического статуса опухолевых клеток. При этом повышенная экспрессия MDM2 способствует восприимчивости опухолевых клеток к ингибиторам гликолиза и окислительного фосфорилирования.

Работа поддержана грантами РФФИ № 17-75- 10205

РЕГУЛЯЦИЯ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА В ПОДОЦИТАХ. © Л.С. Шуйский,¹ Ю.А. Негуляев,¹ А.В. Старуценко,² Д.В. Илатовская.³ ¹Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, ²Медицинский Колледж штата Висконсин, Милуоки, США, ³Медицинский Университет Южной Каролины, Чарльстон, США, leonid.shuyskiy@gmail.com.

В настоящее время более 347 миллионов человек по всему миру страдают сахарным диабетом (СД), и к 2030 году число людей, страдающих диабетом и его осложнениями, превысит 439 миллионов. Одним из самых распространенных осложнений СД является диабетическая нефропатия (ДН) – комплексное нарушение структуры и функций почек. При развитии СД в первую очередь наблюдаются нарушения функции подоцитов – эпителиальных клеток почечного клубочка (гломерулы), которые оплетают капилляры, образуя фильтрационные щели. У пациентов с некомпенсированным течением СД находят гистологические нарушения в ультраструктуре подоцитов (гипертрофию, сглаживание ножковых отростков, фиброз), и подоцитопению (сокращение числа

подоцитов). Уменьшение количества функциональных подоцитов приводит к гломерулосклерозу (замещение подоцитов соединительной тканью), протеинурии (попадание белка в мочу), и в итоге ведет к развитию ДН. Одной из причин повреждения подоцитов на ранних этапах развития СД является нарушение кальциевой сигнализации в этих клетках в результате активации кальций-проводящих каналов. Нами было показано, что в подоцитах гломерул, выделенных из почек крыс с диабетом I типа, значительно повышена активность кальций-проводящих каналов семейства TRPC (Transient Receptor Potential Canonical). Однако вопрос регуляции входа кальция в подоцитах изучен не до конца; данное исследование было направлено на изучение вовлечения депо-зависимого входа кальция в этих клетках. На модели свежевыделенных гломерул крыс возраста 8-12 недель (порода Вистар) были проведены эксперименты по изучению внутриклеточной кальциевой сигнализации в подоцитах – исследовали роль рецептора IP_3 с использованием реагента U-73122 (блокатор фосфолипазы C); исследовали роль комплекса [STIM1-Orai1] с использованием реагента YM-58483 (нарушает функционирование комплекса); исследовали депо-зависимый вход кальция с использованием неспецифического блокатора – реагента 2-APB. Предварительные данные, полученные при помощи эпифлуоресцентной микроскопии *ex vivo* (прижизненное измерение внутриклеточной концентрации свободного кальция с использованием зонда Fura-2AM) с применением различных блокаторов и активаторов депо-зависимого входа (тапсигаргин, 2-APB, YM-58483, U-73122) позволяют заключить, что, помимо входа через кальций-проводящие каналы, депо-зависимый вход кальция может иметь ключевое значение для физиологии подоцитов. Дальнейшие исследования будут направлены на описание механистического аспекта данного сигнального пути, в том числе в ДН. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 18-34-00590.

МАМБАЛГИН-2 ИЗ ЯДА *DENDROASPIS POLYLEPIS*, СПЕЦИФИЧНЫЙ БЛОКАТОР ASIC1a КАНАЛОВ, ИНГИБИРУЕТ РОСТ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК. ©

М.А. Шуленко,^{1,2} М.Л. Бычков,¹ Я.А. Андреев,¹ Д.И. Осмаков,¹ Е.Н. Люкманова.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, mikhailshulepko@gmail.com.

Мультиформные глиобластомы являются самыми частыми и наиболее агрессивными опухолями головного мозга. В первичных глиобластомах на поздних стадиях (стадии III и

IV) субъединицы протон-чувствительных ионных каналов (ASIC) и эпителиальных натриевых каналов (ENaC) образуют химерный рецептор, ингибирование которого приводит к снижению пролиферации и миграции клеток глиобластом.

Мы разработали систему бактериальной продукции рекомбинантного мамбалгина-2 из яда *D.polylepis*, специфичного ингибитора ASIC. Биологическая активность рекомбинантного токсина была протестирована на ооцитах *Xenopus*, экспрессирующих рецептор ASIC1a крысы и оказалась схожей с активностью токсина, выделенного из яда. Было показано, что рекомбинантный мамбалгин-2 не обладает цитотоксическими свойствами, но эффективно подавляет рост клеточных линий глиобластом U251 MG и A172 до ~ 60% в течение 72 часов относительно контроля. Анализ кривой доза-эффект выявил полуэффективные концентрации (EC_{50}) для мамбалгина-2 $\sim 0,6 \pm 0,01$ и $10 \pm 1,6$ нМ для клеток U251 MG и A172, соответственно. Мы также сравнили активность мамбалгина-2 и gefitinib - ингибитора EGFR, предлагаемого для лечения глиобластом. Gefitinib демонстрировал схожие антипролиферативные свойства по отношению к клеткам U251 MG и A172, а совместное применение gefitinib и мамбалгина-2 имело значительный аддитивный эффект в случае клеток U251 MG.

Работа поддержана грантом Президента РФ № СП-4316.2018.4.

IBD КАРТИРОВАНИЕ РЕДКИХ РИСКОВЫХ АЛЛЕЛЕЙ АСТМЫ. © А.У. Юнусбаев.
КФУ, Казань, arslan_yunusbaev@mail.ru.

Полногеномные исследования на больших выборках выявили частые аллели, ассоциированные с астмой [1]. Указанные исследования обладают достаточной статистической мощностью для картирования частых аллелей ($MAF > 5\%$) [2], однако не рассчитаны для детекции редких мутаций. Аллели с малой частотой ($MAF < 5\%$) и редкие аллели (0.1-1%) играют важную роль в наследовании комплексных признаков [3]. Мы применили IBD картирование [4] к ранее опубликованным полногеномным (650k SNP) данным 673 (331 больных, 342 здоровых) индивидов проекта GABRIEL [1] для поиска редких мутаций. Данный подход имеет достаточную мощность для картирования редких аллелей в относительно небольших выборках [5]. Длинный IBD сегмент, являющийся общим только для больных и не встречающийся у здоровых, говорит о наличии рисковой мутации в данном сегменте [5]. Нами выполнено вычисление фаз и попарных IBD сегментов (> 1.0 cM) в BEAGLE 4.0. Далее, используя алгоритм DASH [4], обнаружили 14 тысяч кластеров с множествами индивидов, которые несут перекрывающиеся IBD

сегменты. Кластеры протестировали на обогащенность пациентами. Обнаружили 2 кластера, включающих только больных, при этом общий перекрывающийся IBD сегмент каждого кластера имел длину около 1 сМ. Аллели данных сегментов являются редкими, высоко пенетрантными и унаследованы от недавнего общего предка. Таким образом, обнаружены 2 кандидатных сегмента для дальнейших исследований.

1. Moffatt et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med*. 2010;363: 1211-1221.
2. Hirschhorn & Daly. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*. Nature Publishing Group; 2005; 6: 95.
3. Pritchard JK. Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? *Am J Hum Genet*. 2001;69: 124-137.
4. Gusev et al. DASH: a method for identical-by-descent haplotype mapping uncovers association with recent variation. *Am J Hum Genet*. 2011;88: 706-717.
5. Albrechtsen et al. Relatedness mapping and tracts of relatedness for genome-wide data in the presence of linkage disequilibrium. *Genet Epidemiol*. 2009;33: 266-274.

ОРГАНИЗАТОРЫ



ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

СОВЕТ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ И СПЕЦИАЛИСТОВ ИНЦ РАН

НАУЧНЫЙ СОВЕТ РАН ПО КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

