

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

**XXV ЕЖЕГОДНАЯ НАУЧНАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ**

24-25 января 2017 г., Москва

ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

24 января, вторник

Утреннее заседание, начало в 11 часов

Открытие конференции

Вступительное слово члена-корреспондента РАН
С.В. КОСТРОВА (20 мин)

Председатель – В.З. Тарантул

В.А. ГВОЗДЕВ - зав. Отделом молекулярной генетики клетки (ОМГК). «РНК-хеликаза Bel, белок Piwi и транспозоны в гонадах дрозофилы». (25 мин)

Ю.Я. ШЕВЕЛЕВ - зав. Лабораторией анализа регуляции генов ОМГК. «DamID-картирование районов хромосом, контактирующих с ламинем Dm0, с Pc и с HP1 в нейронах, а также с Piwi в соматических клетках яичников дрозофилы». (20 мин)

Е.Г. ПАСЮКОВА - зав. Лабораторией геномной изменчивости ОМГК. «Исследование механизмов контроля продолжительности жизни у дрозофилы». (20 мин)

П е р е р ы в (15 мин)

Председатель – И.А. Гривенников

А.И. КАЛМЫКОВА – зав. Лабораторией исследования геномных повторов эукариот. «Природная вариабельность эффективности продукции piRNK определяет устойчивость популяций к заражению новыми транспозонами». (20 мин)

А.В. КУЛЬБАЧИНСКИЙ - зав. Лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов ОМГК. «Структура РНК-полимеразы и механизмы регуляции транскрипции у бактерий». (20 мин)

А.В. МАКАРОВА – руководитель Группы специализированных ДНК-полимераз. «Исследование точности репликации поврежденной и неповрежденной ДНК специализированными ДНК-полимеразами человека». (15 мин)

М.А. ПЕТРОВА - зав. Сектором анализа и хранения микроорганизмов ЛМГМ ОМГК. «Плазмиды «древних» природных штаммов *Acinetobacter lwoffii*». (15 мин)

П е р е р ы в

Вечернее заседание, начало в 16 часов

Председатель – А.В. Кульбачинский

К.В. СЕВЕРИНОВ – зав. Лабораторией регуляции экспрессии генов мобильных элементов прокариот. «Структура, функция и эволюция CRISPR-Cas систем адаптивной иммунности прокариот». (20 мин)

А.А. АЛЕКСАНДРОВ - зав. Лабораторией биоинформатики. «Биоинформатика центромер: аннотация альфа сателлита человека и приматов». (20 мин)

А.А. ВОЛОДИН - зав. Лабораторией молекулярной биофизики. «Влияние мультিকатионных лигандов на реакцию обмена нитей ДНК в безбелковых системах». (20 мин)

П е р е р ы в (15 мин)

Председатель – С.А. Лимборская

В.З. ТАРАНТУЛ - руководитель Отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики (ОВКМГ). «Взаимосвязь между процессами репарации и репликации ДНК и цитотоксическим действием ионов марганца». (20 мин)

И.А. ГРИВЕННИКОВ - зав. Лабораторией молекулярной генетики соматических клеток ОВКМГ. «Регуляция процессов пролиферации, дифференцировки и функционирования соматических клеток млекопитающих с помощью генетических и химических факторов в норме и при некоторых патологиях». (20 мин)

А.Г. КОБЫЛЯНСКИЙ – руководитель Центра клеточных и генных технологий (ЦКГТ). «Эмбриональные стволовые клетки мыши – возможности использования в исследовании лекарственных средств». (15 мин)

25 января, среда

Утреннее заседание, начало в 11 часов**Председатель – П.А. Сломинский**

Н.Ф. МЯСОЕДОВ - руководитель Отдела химии физиологически активных веществ (ОХФВ). «Исследование структуры и функции природных пептидов с целью создания новых лекарственных препаратов». (30 мин)

С.И. ШРАМ – зав. Сектором нейрофармакологии ОХФВ. «Участие системы поли(АДФ-рибозил)ирования белков в стресс-индуцированных патологических реакциях кардиомиоцитов на гипергликемию». (15 мин)

С.В. КОСТРОВ - руководитель Отдела молекулярно-генетических основ биотехнологии и белковой инженерии (ОМГОБиБИ). «Опухолевые маркеры, опухолевые модели, противоопухолевые агенты». (25 мин)

П е р е р ы в (15 мин)

Председатель – Е.Г. Пасюкова

И.А. ХМЕЛЬ - зав. Лабораторией регуляции экспрессии генов микроорганизмов. «Биологическая активность вторичных метаболитов бактерий – летучих органических соединений и цианотоксина БМАА». (20 мин)

С.А. ЛИМБОРСКАЯ - зав. Отделом молекулярных основ генетики человека (ОМОГЧ). «Молекулярная генетика человека: медико-генетические и популяционные исследования». (25 мин)

П.А. СЛОМИНСКИЙ - зав. Лабораторией молекулярных основ наследственных заболеваний ОМОГЧ. «Изучение генетических факторов риска мультифакториальных неврологических заболеваний». (20 мин)

В.В. ДЕМКИН - зав. Лабораторией молекулярной диагностики. «Изучение динамики изменений компонентов микробиот человека». (20 мин)

Заключительное слово члена-корреспондента РАН
С.В. КОСТРОВА

Заккрытие конференции

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

РНК-ХЕЛИКАЗА *Bel*, БЕЛОК *Piwi* И ТРАНСПОЗОНЫ В ГОНАДАХ ДРОЗОФИЛЫ

В.А.Гвоздев

Лаборатория биохимической генетики животных
Отдела молекулярной генетики клетки (ОМГК)

Рассматривается природа биологических эффектов при тканеспецифичных нокадаунх РНК-хеликазы *Bel* в семенниках дрозофилы. Нокадаун *Bel* в герминальных клетках приводит к их гибели, тогда как такой нокадаун в соматических клетках заметно не влияет на количество соматических клеток, но приводит к опухолеподобным разрастаниям прилегающих герминальных клеток. Показано, что недостаток *Bel* в соматических клетках не является причиной нарушения сигнальных путей *EGFR* и *Wnt*. Исследовано накопление недифференцированных герминальных клеток в яичниках, вызванное мутациями *Piwi* и *flamenco*, сопровождающихся дерепрессией транспозонов. Показано, что мутации *flamenco* снижают количество соматических эскорт-клеток, участвующих в дифференцировке герминальных клеток и нарушают образование отростков этих клеток, окружающих дифференцирующиеся герминальные клетки. Обнаруженная дисфункция эскортных клеток обусловлена не нарушением функционирования в них сигнального пути *Wnt*, индуцированного активными транспозонами (согласно данным других авторов), а скорее известными прямыми последствиями разрывов ДНК, вызываемых транспозонами. Изучение фенотипа мутации *piwiNt*, нарушающей ядерную локализацию белка *Piwi*, позволяет заключить, что ядерная и цитоплазматическая формы *Piwi* могут регулировать разные стороны функционирования герминальных клеток: присутствие цитоплазматического *Piwi* достаточно для поддержания герминальных стволовых клеток, тогда как ядерная локализация *Piwi* необходима для их правильной пролиферации и дифференцировки. Продолжено исследование роли белка *Piwi* как компонента ядрышка, участвующего в биогенезе рибосомных РНК в оогенезе. Мутации в гене *piwi* сопровождаются снижением количества тотальной зрелой рРНК и появлением крупных фрагментов рРНК; подавлением транспорта новообразованной рРНК

из ядрышка в нуклеоплазму и в цитоплазму (при использовании этилилуридина и метода click-IT); аномальным накоплением транскриптов предполагаемых неактивных копий рДНК, содержащих вставки ретротранспозона R2; тотальным увеличением метки H3K9me3 хроматина рДНК; отсутствием фактора Udd в составе транскрипционного комплекса РНК-полимеразы I. Полученные результаты указывают на нарушение процесса транскрипции и процессинга пре-рРНК в отсутствие Piwi.

DamID-КАРТИРОВАНИЕ РАЙОНОВ ХРОМОСОМ, КОНТАКТИРУЮЩИХ С ЛАМИНОМ Dm0, с Pc и с HP1 В НЕЙРОНАХ, А ТАКЖЕ С PIWI В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ЯИЧНИКОВ ДРОЗОФИЛЫ

Ю.Я.Шевелев

Лаборатория анализа регуляции генов ОМГК

Методом тканеспецифичного DamID-seq в нейронах личинок дрозофилы нами были впервые получены полногеномные профили контактов хромосом с тремя типа репрессоров – с ламином Dm0, с Pc и с HP1. Попарное сравнение профилей в нейронах и в эмбриональных клетках Kc167 выявило консерватизм структуры хромосомных доменов, обогащенных связыванием ламина Dm0 и Pc. В то же время, этот консерватизм отсутствовал для доменов HP1. Оказалось, что, в отличие от клеток Kc167, в нейронах более половины хромосомных районов связаны как с HP1, так и с ламином Dm0. Причем перекрывание доменов HP1 и ламина Dm0 наблюдается как в перицентромерных, так и во многих эухроматиновых районах хромосом. Чтобы проверить, действительно ли обогащенные HP1 перицентромерные районы хромосом находятся в нейронах вблизи от ядерной оболочки, мы провели иммуноокрашивание нейронов личинок третьего возраста и клеток Kc167 антителами к CenpA/CID, выявляющими центромеры, и антителами к ламину Dm0, визуализирующими ядерную оболочку. Подсчет расстояний между центромерами и оболочкой показал, что если в клетках Kc167 радиальное положение кластеров центромер носит случайный характер, то в нейронах это распределение сдвинуто к ядерной ламине. Таким образом, центромерный и перицентромерный

гетерохроматин, обогащенный белком HP1, располагается в нейронах, в отличие от эмбриональных клеток Kc167, преимущественно около ядерной оболочки, тем самым создавая единый репрессорный компартмент из ядерной ламины и HP1. Мы полагаем, что в нейронах существует ранее не описанный у дрозофилы механизм репрессии генов, связанный одновременно с белком HP1 и с ядерной ламинной.

Методом тканеспецифичного DamID-seq мы также определили участки преимущественного контакта Piwi с геномом соматических клеток яичников дрозофилы и идентифицировали около 10800 доменов, обогащенных по Piwi. Домены Piwi значительно перекрывались с участками прикрепления хроматина к ядерным порам (Kalverda et al., 2010), причем наиболее обогащенные по Piwi домены перекрывались с участками связывания ядерных пор на 80%. Неслучайность таких перекрываний была подтверждена коиммунопреципитацией антителами к Piwi из экстрактов соматических клеток яичников компонента ядерных пор Elys и взаимодействующей с ядерными порами субъединицы Xmas-2 комплекса TREF-2, осуществляющего экспорт РНК из ядра в цитоплазму. Как оказалось, 36% генов находятся в доменах, обогащенных по Piwi; при этом многие из них содержат паузированную РНК-полимеразу II на своих промоторах. Однако мы не обнаружили влияния Piwi на транскрипцию этих генов, что подчеркивает необходимость комплементарности между транскриптами и загруженными в Piwi рiРНК для подавления транскрипции. Наши результаты по РНК-иммунопреципитации антителами к Piwi показывают связывание Piwi с транскриптами множества генов и МЭ, которое слабо зависит от количества комплементарных им рiРНК. Однако Piwi несколько эффективнее связывается с транскриптами тех генов, которые находятся в доменах, обогащенных по Piwi, что подтверждает функциональную важность связи Piwi с ядерными порами. Мы предполагаем, что взаимодействие Piwi с ядерными порами может облегчать для Piwi сканирование насцентных транскриптов МЭ, инсертировавших в геном вблизи от мест прикрепления хромосом к ядерным порам и, возможно, транскрибируемых непосредственно в ядерную пору.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ КОНТРОЛЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ У ДРОЗОФИЛЫ

Е. Г. Пасюкова

Лаборатория геномной изменчивости ОМГК

Исследование роли гена *shaggy* и кодируемого им белка GSK3 beta в контроле продолжительности жизни.

Интерес к этому гену вызван двумя причинами. Во-первых, мы предполагаем, что этот ген может играть ключевую роль в сопряжении различных метаболических и сигнальных путей, контролирующих продолжительность жизни. Во-вторых, белок GSK3 beta играет важную роль в развитии патологических состояний нервной системы. В 2015-2016 гг. мы исследовали дифференциальную экспрессию GSK3-beta с целью выявления положительного влияния на продолжительность жизни – именно этот случай представляется наиболее интересным для дальнейшего исследования молекулярных механизмов, обуславливающих увеличение продолжительности жизни. Было показано, что нормальная активность GSK3-beta важна для выживания организма. Сильное увеличение и уменьшение активности фермента в различных тканях снижает продолжительность жизни или летально. Наиболее чувствительна продолжительность жизни к сильным отклонениям от нормальной активности GSK3-beta в период эмбрионального развития, а также в клетках жирового тела и дофаминэргических нейронах взрослых особей. Примечательно, что слабое снижение активности GSK3-beta именно в этих клетках приводит к увеличению продолжительности жизни и замедлению старения. Мутация, снижающая количество белка GSK3-beta, также приводит к увеличению продолжительности жизни. Можно заключить, что слабое снижение активности GSK3-beta способствует долголетию.

Исследовали также эффекты увеличения активности GSK3-beta в нервной системе с целью моделирования патологических состояний этой ткани. Было показано, что сильное увеличение количества/активности GSK3-beta в нервной системе приводит к появлению различных патологий: меняет активность синапсов, количество митохондрий, структуру цитоскелета, количество нейронов, поведение (подвижность).

Анализ продолжительности жизни мух со сниженным количеством транскрипта нейронального гена *shuttle craft (stc)*.

Работа в этом направлении проводится в рамках основной тематики лаборатории – изучении роли изменчивости нейрональных генов в контроле продолжительности жизни. С использованием метода РНК-интерференции, показано, что снижение транскрипции гена *stc*, кодирующего нейрональный транскрипционный фактор, в центральной нервной системе эмбрионов приводит к увеличению продолжительности жизни, в то время как снижение его транскрипции в периферической нервной системе эмбрионов снижает продолжительность жизни. Полученные результаты свидетельствуют о том, что количество транскрипта *stc* в нервной системе эмбрионов является одним из параметров, определяющих продолжительность жизни взрослого организма.

Также продолжено изучение структурно-функциональной изменчивости нейрональных генов, контролирующих продолжительность жизни, в природных популяциях дрозофилы.

Публикации Отдела молекулярной генетики клетки (ДБГЖ, ЛАРГ, ЛГИ, СГВ):

1. Morgunova V, Akulenko N, Radion E, Olovnikov I, Abramov Y, Olenina LV, Shpiz S, Kopytova DV, Georgieva SG, Kalmykova A. Telomeric repeat silencing in germ cells is essential for early development in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43:8762–8773.
2. Pasyukova EG, Symonenko AV, Roshina NV, Trostnikov MV, Veselkina ER, Rybina OY. Neuronal genes and developmental neuronal pathways in *Drosophila* lifespan control. In: *Life Extension, Healthy Ageing and Longevity 3, Life Extension: Lessons from Drosophila*, Vaiserman A. M. et al. (eds.), Springer International Publishing, Switzerland. 2015, p. 3–37.
3. Vaiserman AM, Pasyukova EG. Life extension in *Drosophila* by histone deacetylase inhibitors. In: *Life Extension, Healthy Ageing and Longevity 3, Life Extension: Lessons from Drosophila*, Vaiserman A. M. et al. (eds.), Springer International Publishing, Switzerland. 2015, p. 245–264.
4. Гвоздев ВА, Столяренко АД, Кленов МС. Функции коротких регуляторных РНК (piРНК) и белка Piwi у дрозофилы. *Генетика.* 2015, 51:430–442.

5. Abramov YA, Shatskikh AS, Maksimenko OG, Bonaccorsi S, Gvozdev VA, Lavrov SA. The differences between cis- and trans-gene inactivation caused by heterochromatin in *Drosophila*. *Genetics*. 2016, 202:93–106.
6. Ryazansky SS, Kotov AA, Kibanov MV, Akulenko NV, Korbut AP, Lavrov SA, Gvozdev VA, Olenina LV. RNA helicase Spn-E is required to maintain Aub and AGO3 protein levels for piRNA silencing in the germline of *Drosophila*. *Eur. J. Cell Biol.* 2016, 95:311–322.
7. Kotov AA, Olenkina OM, Kibanov MV, Olenina LV. RNA helicase Belle (DDX3) is essential for male germline stem cell maintenance and division in *Drosophila*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016, 1863:1093–1105.
8. Funikov SY, Ryazansky SS, Kanapin AA, Logacheva MD, Penin AA, Snezhkina AV, Shilova VY, Garbuz DG, Evgen'ev MB, Zatsepina OG. Interplay between RNA interference and heat shock response systems in *Drosophila melanogaster*. *Open Biol.* 2016, 6:160224.
9. Ulianov SV, Khrameeva EE, Gavrilov AA, Flyamer IM, Kos P, Mikhaleva EA, Penin AA, Logacheva MD, Imakaev MV, Chertovich A, Gelfand MS, Shevelyov YY, Razin SV. Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains. *Genome Res.* 2016, 26:70–84.
10. Gavrilov AA, Shevelyov YY, Ulianov SV, Khrameeva EE, Kos P, Chertovich A, Razin SV. Unraveling the mechanisms of chromatin fibril packaging. *Nucleus.* 2016, 7:319–324.
11. Ulianov SV, Shevelyov YY, Razin SV. Lamina-associated chromatin in the context of the mammalian genome folding. *Biopolym. Cell.* 2016, 32:327–333.

**ПРИРОДНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ПРОДУКЦИИ piRNA ОПРЕДЕЛЯЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ
ПОПУЛЯЦИЙ К ЗАРАЖЕНИЮ НОВЫМИ ТРАНСПОЗОНАМИ**

А.И. Калмыкова

Лаборатория исследования геномных повторов эукариот

Столкновение организма с новыми инфекционными ретровирусами, а также горизонтальный перенос транспозонов от других видов представляют серьезную опасность для стабильности генома. Активность мобильных элементов в герминальных тканях подавляется с помощью особого механизма с участием коротких РНК

особой группы, PIWI interacting RNA (piRNA). Такой фенотипический признак, как устойчивость к внедрению транспозонов, очень важен для стабильности генома. Однако до сих пор было неизвестно, что определяет разную степень восприимчивости различных природных популяций к появлению в геноме новых мобильных элементов. Эти вопросы изучаются нами с помощью полногеномных подходов на модельной системе из нескольких природных линий *Drosophila melanogaster*, которые отличаются степенью устойчивости (или реактивностью) к инвазии активного I-элемента. Такие линии, называемые R линии, содержат разрушенные копии I-подобного элемента, сохранившиеся от предыдущей инвазии и продуцирующие piRNA. Мы выявили обратную корреляцию между количеством piRNA, специфичных к I-элементу, и реактивностью линии, что указывает на основную роль именно piRNA-ответа в проявлении разной степени реактивности. Было также замечено, что разные R линии отличаются различной продукцией других типов первичных piRNA в герминальных и соматических клетках яичника, что коррелирует с уровнем продукции piRNA к I-элементу. Изучая причины различий в продукции I-специфичных piRNA на примере двух природных R линий, мы пришли к выводу, что существует природный полиморфизм факторов биогенеза piRNA в целом, что приводит к различиям в количестве первичных piRNA и коррелирует со степенью устойчивости линии к заражению ретроэлементами. Однако такой признак проявляется лишь при заражении новым транспозоном, где важна эффективность первичного ответа, но различия не проявляются по отношению к активным транспозонам, населяющим геном, т.к. механизм амплификации piRNA с участием транскриптов транспозонов сглаживает разницу в количестве первичных piRNA. Исследование природного полиморфизма piRNA системы является новым и перспективным подходом в понимании защитных механизмов генома против инвазии новых ретроэлементов.

В отчетном периоде также проводились эксперименты по очистке теломерного белкового комплекса *Drosophila melanogaster* из ядерных экстрактов культуры клеток и яичников, что необходимо для понимания тканеспецифичности теломерных комплексов. В качестве мишени используется белок Gag-HeT-A, кодируемый основным компонентом теломер дрозофилы - ретротранспозоном HeT-A. Анализ результатов масс-спектрометрии выявил белки-партнеры Gag-HeT-A,

роль которых в теломерном комплексе проверяется экспериментально.

Публикации Лаборатории исследования геномных повторов эукариот:

1. Morgunova V, Akulenko N, Radion E, Olovnikov I, Abramov Y, Olenina LV, Shpiz S, Kopytova DV, Georgieva SG, Kalmykova A. Telomeric repeat silencing in germ cells is essential for early development in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43:8762–8773.
2. Моргунова В.В., Калмыкова А.И.. Роль теломерного белкового комплекса и теломерной РНК в раннем развитии *Drosophila*. *Цитология.* 2016, 58 (5):290–294.
3. И.А. Оловников, В.В. Моргунова, А.А. Миронова, М.Ю. Кордюкова, Е.И. Радион, О.М. Оленкина, Н.В. Акуленко, А.И. Калмыкова Взаимодействие транскриптов теломерного ретроэлемента HeT-A и кодируемого им белка Gag в раннем развитии *Drosophila* *Биохимия.* 2016, т. 81, с. 1283 – 1290.
4. Kordyukova, M. Yu; Antipova, V. N.; Rogachevsky, V. V., Zyrina, N.V. An acid precipitation technique: A strip assay for the large-scale DNA polymerase activity screening. *Analytical Biochemistry.* 2016, v.513, 15, P. 39–42.

СТРУКТУРА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ И МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ У БАКТЕРИЙ

А.В. Кульбачинский

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов ОМГК

Транскрипция является не монотонным процессом, а прерывается многочисленными паузами, которые имеют различную природу и выполняют разнообразные функции в генетической регуляции. За отчетный период мы изучили несколько классов транскрипционных пауз у бактерий и исследовали роль взаимодействий РНК-полимеразы с ДНК-матрицей, РНК-транскриптом и регуляторными факторами в формировании пауз. В частности, получены следующие основные результаты:

- 1) Показано, что альтернативные сигма-факторы РНК-полимеразы способны вызывать паузы на стадии элонгации

транскрипции. На примере стационарной σ^{38} -субъединицы *Escherichia coli* исследованы структурные перестройки транскрипционных комплексов, происходящие при формировании пауз. Показано, что при узнавании промотор-подобного сигнала паузы формируется напряженный промоторный комплекс, который затем переходит в «смещенное» состояние. Охарактеризованы мутации сигма-субъединицы, изменяющие эффективность формирования пауз, что указывает на функции различных участков белка в остановке транскрипции.

2) Установлено, что формирование пауз транскрипции разных классов зависит от контактов кор-фермента РНК-полимеразы с нематричной цепью ДНК спереди от активного центра фермента. Показано, что в зависимости от вторичной структуры РНК-транскрипта эти контакты могут либо подавлять, либо усиливать формирование пауз.

3) Показано, что малые белки бактериофагов gp39 и p7 подавляют паузы и терминацию транскрипции в зависимости от формирования шпилек в синтезируемой РНК.

4) Изучены уникальные факторы транскрипции – Gfh-белки радиоустойчивой бактерии *Deinococcus radiodurans*. Показано, что эти белки стимулируют паузы и терминацию транскрипции, связываясь во вторичном канале РНК-полимеразы и действуя непосредственно на активный центр фермента. Ингибирующая активность этих факторов зависит от присутствия ионов марганца и усиливается в случае сигналов пауз определенного типа и при наличии в ДНК поврежденных нуклеотидов.

Полученные результаты показывают, что в узнавании сигналов пауз важную роль играют специфические контакты РНК-полимеразы с ДНК и РНК, а остановка транскрипции сопровождается значительными структурными перестройками РНК-полимеразы, которые могут являться мишенью для действия клеточных и фаговых регуляторных факторов.

ПЛАЗМИДЫ «ДРЕВНИХ» ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ *ACINETOBACTER LWOFFII*

М.А. Петрова

Сектор анализа и хранения микроорганизмов (ЛМГМ ОМГК)

В 2015-2016 гг. продолжено изучение мобильных элементов природных бактерий, участвующих в горизонтальном переносе генов устойчивости к антибиотикам и солям тяжелых металлов. Основное внимание было уделено исследованию плазмид *Acinetobacter lwoffii* и их роли в распространении генов устойчивости к антибиотикам и тяжелым металлам. По состоянию исследований на 2015 г. число секвенированных плазмид из штаммов *Acinetobacter* составляло 90. Однако подавляющее большинство этих плазмид выделены из патогенных клинических штаммов *A. baumannii*, тогда как плазмиды других видов акинетобактеров практически не исследованы. В то же время все чаще появляются сведения о проникновении в клинику штаммов акинетобактеров других видов, в частности *A. lwoffii*, для которых характерно наличие большого количества плазмид. Таким образом, исследования молекулярной организации плазмид и локализованных на них детерминант устойчивости, распространенных среди природных и клинических штаммов *A. lwoffii* и родственных видов, важны для понимания процессов, участвующих в адаптации бактерий к изменению условий их существования, а также представляют практический интерес.

Нами было проведено секвенирование геномов пяти штаммов *Acinetobacter lwoffii*, выделенных из многолетнемерзлых отложений возрастом 15 тыс. - 3 млн лет, и проанализированы гены устойчивости, обнаруженные в составе их плазмид и хромосом. Было собрано 36 полных геномов плазмид, что на треть увеличило число отсекуемых плазмид штаммов *Acinetobacter*. Среди исследованных плазмид идентифицированы репликоны, содержащие гены устойчивости к различным солям тяжелых металлов и/или антибиотикам. Все крупные плазмиды и некоторые средние и мелкие плазмиды содержали гены, кодирующие устойчивость к соединениям мышьяка и различным тяжелым металлам: ртути, кобальту, цинку, кадмию, меди, хрому. Причем в каждом из пяти штаммов была обнаружена крупная плазида (от 134768 до 287630 пн), в состав которой входил «локус устойчивости», содержащий не менее двух типов детерминант устойчивости к тяжелым металлам или мышьяку. Впервые у штаммов рода *Acinetobacter* были обнаружены плазмиды размером более 190 тпн, а также штамм, содержащий одновременно 12 плазмид. Установлено, что по расположению генов и их набору детерминанты устойчивости к меди и мышьяку акинетобактеров отличаются от описанных ранее. Близкородственные аналоги

большинства генов устойчивости, найденных в «древних» штаммах *A. lwoffii*, были обнаружены на плаزمидах современных клинических штаммов *A. lwoffii*. Подавляющее большинство детерминант устойчивости, расположенных на хромосомах *A. lwoffii*, содержали неполные наборы генов устойчивости или содержали поврежденные гены. Показано, что все плазмидные детерминанты устойчивости являются функционально активными.

Сравнительный анализ геномов различных штаммов *A. lwoffii* и *Acinetobacter baumannii* выявил ряд отличий между этими видами: (I) размеры хромосом у *A. baumannii* превышали таковые у *A. lwoffii* примерно на 20%; (II), наоборот, количество плазмид в *A. lwoffii* и их общий размер были значительно выше, чем у *A. baumannii*; (III) число и разнообразие генов устойчивости к тяжелым металлам в природных штаммах *A. lwoffii* было существенно выше, чем у штаммов *A. baumannii*, а также, в отличие от последних, они были в основном локализованы на плазмидах. Вполне вероятно, что эти отличия связаны с различными условиями жизни штаммов, принадлежащих к этим двум видам.

**Публикации Лаборатории молекулярной генетики
микроорганизмов ОМГК:**

1. Есюнина Д.М., Кульбачинский А.В. Выделение и характеристика рекомбинантной РНК-полимеразы *Deinococcus radiodurans*. Биохимия. 2015. 80:1542-1550.
2. Агапов А.А., Кульбачинский А.В. Механизмы стрессоустойчивости и регуляция экспрессии генов у радиорезистентной бактерии *Deinococcus radiodurans*. Биохимия. 2015. 80:1461-1479.
3. Petushkov I, Pupov D, Bass I, Kulbachinskiy A. Mutations in the CRE pocket of bacterial RNA polymerase affect multiple steps of transcription. *Nucleic Acids Res.* 2015. 43:5798-5809.
4. Pupov D., Kulbachinskiy A. Single-stranded DNA aptamers for functional probing of bacterial RNA polymerase. *Methods Mol. Biol.* 2015. 1276:165-183.
5. Esyunina D., Klimuk E., Severinov K., Kulbachinskiy A. Distinct pathways of RNA polymerase regulation by a phage-encoded factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. 112:2017-2022.
6. Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Мелькина О.Е., Балабанов В.П., Миндлин С.З. Протеолитический контроль антирестрикторной

активности неконкюгативных транспозонов Tn21, Tn5053, Tn5045, Tn501, Tn402. Молекулярная биология, 2015, т. 49, № 2, с. 334-341.

7. Agapov A., Esyunina D., Pupov D., Kulbachinskiy A. Regulation of transcription initiation by Gfh factors from *Deinococcus radiodurans*. Biochemical Journal. 2016. 473:4493-4505.

8. Esyunina D., Agapov A., Kulbachinskiy A. Regulation of translational pausing through the secondary channel of RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. 113:8699-8704.

9. Esyunina D., Turtola M., Pupov D., Bass I., Klimašauskas S., Belogurov G., Kulbachinskiy A. Lineage-specific variations in the trigger loop modulate RNA proofreading by bacterial RNA polymerases. Nucleic Acids Res. 2016. 44:1298-1308.

10. Miropolskaya N., Kulbachinskiy A. Aptamers to the sigma factor mimic promoter recognition and inhibit transcription initiation by bacterial RNA polymerase. Biochem Biophys Res Commun. 2016. 469:294-299.

11. Anton Kurakov, Sofia Mindlin, Alexey Beletsky, Natalya Shcherbatova, Andrey Rakitin, Aleksandra Ermakova, Andrey Mardanov, Mayya Petrova. The ancient small mobilizable plasmid pALWED1.8 harboring a new variant of the non-cassette streptomycin/spectinomycin resistance gene aadA27. *Plasmid*. 2016, 84-85:36-43.

12. Sofia Mindlin, Anatoliy Petrenko, Anton Kurakov, Alexey Beletsky, Andrey Mardanov, Mayya Petrova. Resistance of Permafrost and Modern *Acinetobacter lwoffii* Strains to Heavy Metals and Arsenic Revealed by Genome Analysis. BioMed Research International. 2016, 3970831.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОЧНОСТИ РЕПЛИКАЦИИ ПОВРЕЖДЕННОЙ И НЕПОВРЕЖДЕННОЙ ДНК СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫМИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ ЧЕЛОВЕКА

Макарова А.В.

Группа «Специализированные ДНКП»

Группа создана в середине 2015 г. и занимается исследованием специализированных ДНК-полимераз (спецДНКП) человека, основной функцией которых является репликация и репарация ДНК с повреждениями. Группой проводятся исследования по трем основным направлениям:

1) изучение функций спецДНКП человека в клетке: роль спецДНКП в прохождении разных типов биологически значимых повреждений ДНК и включение неканонических нуклеотидов при репликации;

2) изучение молекулярных механизмов репликации и регуляции активности спецДНКП;

3) связь спецДНКП с развитием заболеваний у человека: влияние мутаций и аллельных полиморфизмов спецДНКП, обнаруженных у онкологических пациентов, на точность и эффективность репликации поврежденной ДНК.

В настоящий момент исследования проводятся для трех ДНКП: Pol ι , Pol η и новой ДНКП с праймазной активностью PrimPol. Разрабатываются методы очистки четырехсубъединичного комплекса Pol ζ человека из культуры клеток человека. В докладе будут представлены исследования PrimPol человека.

PrimPol – новая спецДНКП человека, впервые выделенная и описанная в 2013 г. PrimPol обладает не только ДНК-полимеразной, но и ДНК-праймазной активностью и обнаруживается как в ядре, так и в митохондриях. PrimPol осуществляет репликацию поврежденной ДНК с помощью двух механизмов: непосредственное включение нуклеотидов напротив повреждения (ДНК-полимеразная активность) и инициация синтеза ДНК после поврежденного участка *de novo* (ДНК-праймазная активность). Делеция *PrimPol* приводит к падению скорости репликации геномной ДНК, хромосомной нестабильности и снижению копийности митохондриальной ДНК в клетках человека.

В 2015-2016 гг. мы разработали методы выделения рекомбинантной PrimPol человека из клеток *E. coli* и *S. cerevisiae* и охарактеризовали ДНК-полимеразную активность PrimPol на ДНК-матрицах разной структуры в присутствии разных ионов-кофакторов (Mg²⁺ и Mn²⁺) и регуляторных репликативных факторов. Впервые нами была обнаружена активность PrimPol по замещению цепи ДНК (strand displacement activity) и показано, что она стимулируется ионами Mn²⁺. Также нами было проведено исследования эффективности и точности включения нуклеотидов напротив наиболее распространенных и биологически значимых повреждений ДНК: 8-охо-G, тимидин гликоля, АП-сайтов, 5-O⁶-me-G, etheno-A, Т-Т пиримидиновых димеров, урацила и 5-формилурацила. Показано, что с наибольшей точностью и эффективностью PrimPol осуществляет репликацию напротив 8-охо-G (наиболее распространенного

повреждения, вызванного окислительным стрессом). Ионы Mn^{2+} стимулируют репликацию напротив всех повреждений ДНК, снижая точность включения нуклеотидных субстратов.

В результате воздействия активных форм кислорода митохондриальная ДНК подвергается повреждениям гораздо чаще, чем ядерная. Механизм репликации поврежденной ДНК в митохондриях неизвестен. В присутствии митохондриальных репликативных ферментов и регуляторных факторов (mtSSB, Pol γ , хеликаза Twinkle) было проведено исследование репликации поврежденной ДНК с участием PrimPol. Показано, что PrimPol функционально взаимодействует с митохондриальной хеликазой Twinkle, которая стимулирует ДНК-полимеразную активность PrimPol в отсутствие АТФ. Однако добавление PrimPol к митохондриальной реплисоме привело лишь к незначительному увеличению эффективности репликации поврежденной ДНК. Обсуждаются возможные механизмы участия PrimPol в репликации митохондриальной ДНК.

Исследования репликации PrimPol проведены в сотрудничестве с лабораториями чл.-корр. РАН О.И. Лаврик (ИХБФМ СО РАН) и проф. Ш. Варной (Университет Умеа, Швеция).

Публикации группы «Специализированные ДНК-полимеразы»:

1. Makarova A.V., Burgers P.M. Eukaryotic DNA polymerase ζ // DNA Repair. 2015, 29:47–55.
2. Stojkovič G., Makarova A.V., Wanrooij P.H., Forslund J., Burgers P.M., Wanrooij S. Oxidative DNA damage stalls the human mitochondrial replisome // Scientific Reports. 2016, 6:28942.

СТРУКТУРА, ФУНКЦИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ CRISPR-CAS СИСТЕМ АДАПТИВНОЙ ИММУНОСТИ ПРОКАРИОТ

К.В. Северинов

Лаборатория регуляции экспрессии генов мобильных элементов прокариот

CRISPR-Cas системы адаптивного иммунитета прокариот состоят из CRISPR-кассет, участков генома с идентичными повторами и

разделяющими их уникальными спейсерами, и *cas* генов. CRISPR-касеты и *cas* гены вместе способны обеспечивать устойчивость клеток к бактериофагам и плазмидам, которые содержат протоспейсеры - последовательности, комплементарные спейсерам CRISPR-касеты. Механизм действия CRISPR-Cas систем условно можно разбить на два модуля: CRISPR интерференции, т.е. высокоспецифичное узнавание протоспейсера мишени и внесения разрыва в него, и CRISPR адаптации, т.е. изменение генома клетки за счет встраивания новых спейсеров. Направленное встраивание спейсеров из чужеродной ДНК может рассматриваться как уникальный пример ламарковского наследования. Многообразие механизмов CRISPR интерференции позволило выделить два класса, пять типов и множество подтипов CRISPR-Cas систем. Развитие технологий, основанных на механизме CRISPR интерференции, опосредованном Cas9 белком систем второго типа, произвело переворот в области редактирования геномов, так как позволило избирательно, эффективно и относительно просто вносить направленные разрывы в целевые участки ДНК. Однако этим примером далеко не исчерпываются возможности практического применения CRISPR-Cas систем. В докладе будут обсуждены новые данные, полученные в нашей лаборатории, о разнообразии механизмов CRISPR интерференции и адаптации и перспективам их использования в биотехнологии.

**Публикации Лаборатории регуляции экспрессии генов
мобильных элементов прокариот:**

1. Beloglazova N., Kuznedelov K., Flick R., Datsenko K.A., Brown G., Popovic A., Lemak S., Semenova E., Severinov K., Yakunin A.F. CRISPR RNA binding and DNA target recognition by purified Cascade complexes from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43, 530-43.
2. Boudry P., Semenova E., Monot M., Datsenko K.A., Lopatina A., Sekulovic O., Ospina-Bedoya M., Fortier L.C., Severinov K., Dupuy B., Soutourina O. Function of the CRISPR-Cas system of the human pathogen *Clostridium difficile*. *MBio.* 2015, 6, e01112-15.
3. Semenova E., Kuznedelov K., Datsenko K.A., Boudry P.M., Savitskaya E.E., Medvedeva S., Beloglazova N., Logacheva M., Yakunin A.F., Severinov K. The Cas6e ribonuclease is not required for interference and adaptation by the *E. coli* type I-E CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43, 6049-61.

4. Zenkin N., Severinov K., Yuzenkova Y. Bacteriophage Xp10 anti-termination factor p7 induces forward translocation by host RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43, 6299-308.
5. Esyunina D., Klimuk E., Severinov K., Kulbachinskiy A. Distinct pathways of RNA polymerase regulation by a phage-encoded factor// *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015, 112, 2017-22.
6. Mekler, V., Severinov K. RNA polymerase molecular beacon as tool for studies of RNA polymerase-promoter interactions. *Methods.* 2015, 86, 19-26.
7. Pletzer D., Braun Y., Dubiley S., Lafon C., Köhler T., Page M.G., Mourez M., Severinov K., Weingart H. The *Pseudomonas aeruginosa* PA14 ABC transporter NppA1A2BCD is required for uptake of peptidyl nucleoside antibiotics. *J Bacteriol.* 2015, 197, 2217-2228.
8. Vorontsova D., Datsenko K.A., Medvedeva S., Bondy-Denomy J., Savitskaya E.E., Pougach K., Logacheva M., Wiedenheft B., Davidson A.R., Severinov K., Semenova E. Foreign DNA acquisition by the I-F CRISPR-Cas system requires all components of the interference machinery. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43, 10848-60.
9. Xue C., Seetharam A.S., Musharova O., Severinov K., Brouns S.J., Severin A.J., Sashital D.G. CRISPR interference and priming varies with individual spacer sequences. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43, 10831-47.
10. Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell.* 2015 Nov 5; 60(3):385-97.
11. Messina E, Sorokin DY, Kublanov IV, Toshchakov S, Lopatina A, Arcadi E, Smedile F, La Spada G, La Cono V, Yakimov MM. Complete genome sequence of 'Halanaeroarchaeum sulfurireducens' M27-SA2, a sulfur-reducing and acetate-oxidizing haloarchaeon from the deep-sea hypersaline anoxic lake Medee. *Stand Genomic Sci.* 2016 May 13; 11:35.
12. Kuznedelov K., Mekler V., Lemak S., Tokmina-Lukaszewska M., Datsenko K.A., Jain I., Savitskaya E., Mallon J., Shmakov S., Bothner B., Bailey S., Yakunin A.F., Severinov K., Semenova E. Altered stoichiometry *Escherichia coli* Cascade complexes with shortened CRISPR RNA spacers are capable of interference and primed adaptation. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44, 10849-10861.
13. Severinov K., Ispolatov I., Semenova E. The influence of copy-number of targeted extrachromosomal genetic elements on the outcome of CRISPR-Cas defense. *Front Mol Biosci.* 2016, 3, 45.

14. Semenova E., Savitskaya E., Musharova O., Strotskaya A., Vorontsova D., Datsenko K.A., Logacheva M.D., Severinov K. Highly efficient primed spacer acquisition from targets destroyed by the *Escherichia coli* type I-E CRISPR-Cas interfering complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016, 113, 7626-31.
15. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I.M., Cox D.B., Shmakov S., Makarova K.S., Semenova E., Minakhin L., Severinov K., Regev A., Lander E.S., Koonin E.V., Zhang F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. Science. 2016, 5, 353(6299):aaf5573.
16. Lopatina A., Medvedeva S., Shmakov S., Logacheva M.D., Krylenkov V., Severinov K. Metagenomic analysis of bacterial communities of antarctic surface snow. Front Microbiol. 2016, 7, 398.
17. Mekler V., Minakhin L., Semenova E., Kuznedelov K., Severinov K. Kinetics of the CRISPR-Cas9 effector complex assembly and the role of 3'-terminal segment of guide RNA. Nucleic Acids Res. 2016, 44, 2837-45.
18. Savitskaya E.E., Musharova O.S., Severinov K.V. Diversity of CRISPR-Cas-mediated mechanisms of adaptive immunity in prokaryotes and their application in biotechnology. Biochemistry (Mosc). 2016, 81, 653-61.
19. Lavysch D., Sokolova M., Minakhin L., Yakunina M., Artamonova T., Kozyavkin S., Makarova K.S., Koonin E.V., Severinov K. The genome of AR9, a giant transducing *Bacillus* phage encoding two multisubunit RNA polymerases. Virology. 2016, 495, 185-96.
20. Yakimov MM, Crisafi F, Messina E, Smedile F, Lopatina A, Denaro R, Pieper DH, Golyshin PN, Giuliano L. Analysis of defence systems and a conjugative IncP-1 plasmid in the marine polyaromatic hydrocarbons-degrading bacterium *Cycloclasticus* sp. 78-ME. Environ Microbiol Rep. 2016 Aug; 8(4):508-19.

БИОИНФОРМАТИКА ЦЕНТРОМЕР: АННОТАЦИЯ АЛЬФА САТЕЛЛИТА ЧЕЛОВЕКА И ПРИМАТОВ

А.А. Александров

Лаборатория биоинформатики

Совместно с ФГБНУ НЦПЗ создан полный каталог повторяющихся единиц высокого порядка (ПЕВП) альфа сателлита (АС) человека на основе АС референс-моделей последней геномной сборки. Дополнительно обнаружен новый класс АС повторов –

дивергентные (в отличие от гомогенных) ПЕВП. Они представлены небольшими доменами, встречаются как в старых, так и в новых семействах АС и не были описаны ранее. Также обнаружен ряд новых минорных гомогенных семейств АС, не представленных в референс-моделях. Часть из них идентифицированы как архаические поколения новых семейств SF1 и SF2, не исследованные ранее. Наличие архаических доменов в новых семействах АС свидетельствует о многоступенчатой эволюции современных центромер человека от общего с шимпанзе предка. Дивергентные семейства АС, в отличие от гомогенных, оказались общими для шимпанзе и человека. Наличие каталога позволило создать программу распознавания ПЕВП доменов в геномных последовательностях человека на платформе HHMER. Она работает и на древних геномах рода *Homo*, расшифрованных в результате полногеномного секвенирования нового поколения (NGS). При этом дивергентные семейства АС будут распознаваться также и в геномах человекообразных обезьян.

Исследована судьба второй хромосомы – единственного известного крупного морфологического отличия кариотипов человека и шимпанзе. Имеющийся в q-плече хромосомы 2 мертвый АС домен действительно является остатком центромеры 2q общего предка человека и шимпанзе, утраченной после слияния у предка человека хромосом 2p и 2q. Показано, что остаток центромеры включает фрагменты слоев Ea и Ga, а также фрагмент архаического SF2. Предложена схема эволюции указанной центромеры, включающая расселение фрагментов умершей центромеры на другие хромосомы в виде сегментных дупликаций. Исследование центромеры пятой хромосомы шимпанзе показало, что она, скорее всего, сформирована на АС старого семейства (SF5). Однако, ее ПЕВП не найдена ни у орангутана, у которого, как мы показали ранее, большинство центромер сформировано SF5, а также не соответствует ни одному домену SF5 человека. Эта ПЕВП представляет собой амплификацию материала, родственного димерному дивергентному семейству S5C1H5, общему у человека и шимпанзе. Получены также данные в пользу еще одного крупного отличия – делеции центромеры и почти полной делеции мертвых слоев хромосомы 4 у предка человека. Эти последовательности сохраняются у шимпанзе и присутствуют в сборке ее генома. Совместно с ИОГен РАН документирована эта делеция у человека *in silico*.

Проведено исследование центромерных последовательностей гориллы и сравнение результатов с выводами работы *Catacchio et al.*, 2015. У последнего общего предка гориллы и человека впервые появляются новые семейства АС, унаследованные гориллой, шимпанзе и человеком. Выполнена аннотация надхромосомных семейств в существующей далеко не полной геномной сборке гориллы и охарактеризованы дополнительные контиги гориллы (как обычные, так и полученные с помощью длиномерного секвенирования PacBio), содержащие все три новых семейства (SF1-3). SF1 и SF3 представлены типичными для этих семейств мономерными классами. В SF2 кроме двух типичных классов D1 и D2 имеются широко представленные новые мономерные классы, полученные путем рекомбинации двух основных. Эти классы специфичны для гориллы и отражают эволюцию SF2 после отхождения горилл от общей ветви человекообразных обезьян. Организация мономерных классов в ПЕВП у гориллы существенно отличается от присущей человеку. Идентифицированные ПЕВП позволяют приступить к созданию классификатора ПЕВП гориллы на основе платформы HHMER. В настоящее время такой классификатор создан нами для человека и тестируется. Для недостаточно исследованной гориллы он стал бы инструментом дальнейшего исследования и позволил бы описать ПЕВП новых семейств исчерпывающим образом, как это сделано для человека.

Публикации Лаборатории биоинформатики:

1. *Shepelev VA, Uralsky LI, Alexandrov AA, Yurov YB, Rogaev EI, Alexandrov IA.* Annotation of suprachromosomal families reveals uncommon types of alpha satellite organization in pericentromeric regions of hg38 human genome assembly. *Genom Data.* 2015 Sep 1; 5:139-146.
2. *Fedoseyeva V., Zharinova I., Alexandrov A.* Secondary structure-stretched forms of long intron rna products from the view point of initiation of chromosome homologs somatic pairing *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* 2015. Т. 33. № 4. С. 869-876.
3. *Ziccardi W, Zhao C, Shepelev V, Uralsky L, Alexandrov I, Andreeva T, Rogaev E, Bun C, Miller E, Putonti C, Doering J.* Clusters of alpha satellite on human chromosome 21 are dispersed far onto the short arm and lack ancient layers. *Chromosome Res.* 2016 Sep; 24(3):421-36.

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИКАТИОННЫХ ЛИГАНДОВ НА РЕАКЦИЮ ОБМЕНА НИТЕЙ ДНК В БЕЗБЕЛКОВЫХ СИСТЕМАХ.

А.А. Володин

Лаборатория молекулярной биофизики

Продолжено изучение реакции обмена нитей под действием лигандов катионной природы. Способность таких лигандов ускорять реакцию обмена нитей подтверждена на примере спермина, хлорохина и кристаллического фиолетового. Молекулы этих веществ несут как электростатический заряд, так и гидрофобную группу. Все три лиганда при их низкой концентрации замедляют реакцию обмена нитей за счёт стабилизации ДНК дуплекса. При повышении концентраций происходит ускорение реакции обмена. Анализ реакции в этих условиях при помощи её титрования избытком конкурирующего олигонуклеотида показывает, что она ускоряется за счёт ветви, сопровождающейся образованием ДНК триады - промежуточной формы, включающей три олигонуклеотида.

В ряду спермин – хлорохин – кристаллический-фиолетовый число положительных зарядов уменьшается, а гидрофобная группа увеличивается, что сопровождается уменьшением концентрации, при которой реакция обмена нитей начинает ускоряться. Это показывает, что в ускорении реакции обмена нитей главную роль играют гидрофобные взаимодействия, а роль электростатических зарядов гораздо менее выражена. Такое предположение согласуется с относительно более слабым ускорением реакции обмена в присутствии некоторых ионов металлов.

На примере разных по химической природе лигандов подтверждено отсутствие корреляции между стабильностью ДНК дуплекса и скоростью реакции обмена.

Сложный характер зависимости скорости реакции от концентрации лиганда, видимо, также довольно общее свойство лигандов ускоряющих реакцию обмена нитей, связанное с механизмами их взаимодействия с ДНК.

Наши результаты подтверждают, что способность ускорять реакцию обмена нитей ДНК является довольно общим свойством мультикационных лигандов различных химических классов, и этот

обмен, видимо, является новым, независимым аспектом молекулярной динамики ДНК.

Публикации Лаборатории молекулярной биофизики:

1. Gabrielian, A., Bocharova, T.N., Smirnova, E.A., Volodin, A.A., Harutjunyan, A., Gevorkyan, K. 137 Influence of 1,3-diazaadamantane derivative on the strand exchange between short oligonucleotides. J Biomol Struct Dyn. 2015, 33:Suppl 1:88-9.
2. Volodin, A.A., Bocharova, T.N., Smirnova, E.A. Polycationic ligands of different chemical classes stimulate DNA strand displacement between short oligonucleotides in a protein-free system. Biopolymers. 2016, 105:633-641.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ПРОЦЕССАМИ РЕПАРАЦИИ И РЕПЛИКАЦИИ ДНК И ЦИТОТОКСИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ МАРГАНЦА

В.З. Тарантул

Лаборатория репликации и репарации генома (ЛРРГ)
Отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики (ОВКМГ)

Марганец (Mn) является необходимым для жизнедеятельности клетки элементом с большим количеством биологических функций. Вместе с тем его поступление в организм в больших дозах в течение длительного времени, может вызывать такие нейродегенеративные заболевания как манганизм и паркинсонизм. Молекулярные механизмы, приводящие к такой токсичности марганца, до конца не известны. В настоящее время считается, что патофизиологические процессы, вызываемые ионами марганца, могут быть универсальными и влиять на несколько метаболических путей. Нами было выдвинуто предположение, что одним из таких путей может быть влияние Mn на процессы репликации и репарации ДНК. Для проверки этого предположения в настоящей работе были использованы несколько линий клеток SKOV-3, устойчивых к токсическому действию ионов марганца. Ранее нами было показано, что в таких клетках происходит значительная активация поли(АДФ-рибоза)-полимеразы. Дальнейшие наши исследования показали, что в экстрактах клеток, устойчивых к высоким концентрациям Mn, по

сравнению с исходными клетками SKOV-3, обнаружена также повышенная способность удалять некорректный нуклеотид с 3'-конца (3'-эксонуклеазная активность) и встраивать вместо него корректный в процессе синтеза ДНК. Кроме того, в экстрактах клеток, устойчивых к ионам марганца, была почти в 4 раза повышена активность AP-эндонуклеазы, делающей однонитевые разрывы в участках ДНК, лишенных азотистых оснований. Эти ферменты в эукариотических клетках являются одними из ключевых компонентов молекулярного механизма, ответственного за репарацию участков ДНК, содержащих повреждения, посредством удаления азотистых оснований – эксцизионная репарация ДНК, BER (Base Excision Repair). Анализ транскрипции генов, кодирующих некорректные ДНК-полимеразы, показал, что у некоторых из них активность в клетках, устойчивых к ионам марганца, существенно повышается по сравнению с нормой. В частности, в этих клетках обнаружена повышенная экспрессия генов, кодирующих ДНК-полимеразу бета ($Pol\beta$) и ДНК-полимеразу йота ($Pol\iota$), которые наряду с другими ферментами участвует в процессе BER. Полученные данные подтверждают наше предположение о том, что, по крайней мере, одной из причин нейротоксичности ионов марганца и манганизма, возникающего *in vivo* в результате действия этих ионов, может быть недостаточная эффективность процессов репарации и репликации ДНК для преодоления повреждений ДНК, возникающих в клетке под воздействием высоких концентрациях ионов Mn. Поскольку в клетках, устойчивых к токсическим концентрациям ионов Mn, повышена активность ферментов, которые участвуют в BER, можно предположить, что основные повреждения ДНК, вызываемые ионами марганца, связаны с модификациями одиночных оснований. Дополнительные эксперименты с $Pol\iota$ показали также, что укороченная форма этого фермента, синтезируемая в результате альтернативного сплайсинга 2-ого экзона, не обладает заметной ДНК-полимеразной активностью даже в присутствии ионов Mn, которые являются сильными стимуляторами этого фермент *in vitro*.

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В НОРМЕ И ПРИ НЕКОТОРЫХ ПАТОЛОГИЯХ.

И.А. Гривенников

Лаборатория молекулярной генетики соматических клеток
ОВКМГ

Продолжены работы по созданию клеточных моделей болезни Паркинсона (БП) на основе индуцированных плюрипотентных стволовых (ИПС) клеток от пациентов, страдающих различными формами этого заболевания.

Такие модели позволяют изучать молекулярно-генетические основы различных нейродегенеративных заболеваний человека. Относительно недавно были выявлены широкие биологические активности белков TRIM семейства, такие как участие в процессах клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза. К настоящему времени известно около 60 белков этого семейства. Оказалось, что один из представителей этого обширного семейства TRIM 9 может быть связан с развитием БП. Было обнаружено, что количество этого белка существенным образом уменьшается в зонах мозга, подверженных дегенерации при БП и других дегенерациях, связанных с формированием телец Леви.

С помощью ПЦР в реальном времени была проанализирована экспрессия 15 *trim* генов, относящихся к разным группам этого семейства, в дифференцированных ИПС клетках, полученных от здоровых доноров, пациентов с врожденными формами и спорадической формой БП. Показано, что экспрессия только 4-х *trim* генов (*trim5α*, 26, 27, 31) оставалась неизменной на разных стадиях дифференцировки ИПС клеток от пациентов с БП по сравнению с контролем. В тоже время *trim 6* и *trim 24* гены существенным образом уменьшали уровень своей экспрессии в дифференцированных в нейрональном направлении ИПС клетках, полученных от пациентов с различными формами БП. Сделано предположение, что развитие БП может быть связано с нарушениями в экспрессии ряда *trim* генов, вовлеченных, как было показано ранее, в функционирование иммунной системы.

Известно, что каннабиноидные рецепторы 1-го типа (КР1) играют важную роль в развитии и функционировании нервной системы. Методом иммуноцитохимии было показано присутствие данного рецептора на разных стадиях дифференцировки ИПС клеток в нейрональном направлении. На модели нейрональных предшественников было проведено исследование влияния каннабиноидов АДА (N-Arachidonoyldopamine) и ДДА (docosahexaenoyldopamine) на пролиферативную активность клеточных культур, а также оценена их способность оказывать нейропротекторные эффекты в условиях окислительного стресса, вызванного добавлением перекиси водорода. Показано, что каннабиноид ДДА в концентрациях 1 и 5 мкМ на 30 % увеличивал количество жизнеспособных клеток при окислительном стрессе и оказывал большую степень защиты, чем известные своими нейропротекторными свойствами пептиды семакс и альфа-МСГ. Проведены эксперименты по тестированию ряда новых пептидов, синтезированных в Отделе химии физиологически активных веществ, на дифференцированных в нейрональном направлении ИПС клетках, полученных от пациентов с разными формами БП, в условиях окислительного стресса. Выявлен пептид, который статистически достоверно защищает клетки от окислительного стресса. Таким образом, на основе ИПС клеток человека разработана многоуровневая тест – система (включающая недифференцированные ИПС клетки, клетки находящиеся на начальных стадиях дифференцировки и дифференцированные в нейрональном направлении клетки) для оценки цитотоксичности, эмбриотоксичности и нейропротекторной активности различных химических соединений.

**Публикации Отдела вирусной и клеточной
молекулярной генетики:**

1. Nenasheva V.V., Kovaleva G.V., Uryvaev L.V., Ionova K.S., Dedova A.V., Vorkunova G.K., Chernyshenko S.V., Khaidarova N.V., Tarantul V.Z. Enhanced expression of *trim14* gene suppressed Sindbis virus reproduction and modulated the transcription of a large number of genes of innate immunity. Immunologic Res. 2015, 62, 255-262.

2. Холодий Г.Я., Тарантул В.З. Дифференциальная активность сайтов инициации репликации ДНК, расположенных в хромосомной полосе 9P22 человека. Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. 2015, №1, 11-14.
3. Захидов С. Т., Рудой В.М., Дементьева О.В., Муджири Н.М., Макарова И.В., Зеленина И.А., Андреева Л.Е., Маршак Т.Л. Влияние ультрамалых наночастиц золота на хроматин нативных спермиев мышей. Известия РАН, серия биологич. 2015, № 6, 1–8.
4. Захарчева К.А., Генинг Л.В., Тарантул В.З. Изучение механизмов цитотоксичности ионов марганца. В сборнике: Современные проблемы гуманитарных и естественных наук. Научно-информационный издательский центр "Институт стратегических исследований". 2015, 40-46.
5. Коновалова Е.В., Новосадова Е.В., Гривенников И.А., Иллариошкин С.Н. Фенотипические различия культур нейронов, получаемых путем репрограммирования фибробластов пациентов с мутациями в генах паркинсонизма LRRK и PARK2. Бюлл. эксп. биол. и мед. 2015, 159, №6, 749-753.
6. Коновалова Е.В., Ивашкин Е.Г., Лопачёв А.В., Лопачёва О.М., Комиссаров А.А., Гривенников И.А., Новосадова Е.В., Дашинимаев Э.Б., Федотова Е.Ю., Иллариошкин С.Н. Функциональные свойства дофаминергических нейронов, полученных из фибробластов пациента с PARK2-формой болезни Паркинсона. Журн. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015, №12, 103-107.
7. Коновалова Е.В., Лопачева О.М., Гривенников И.А., Лебедева О.С., Дашинимаев Э.Б., Хаспеков Л.Г., Федотова Е.Ю., Иллариошкин С.Н. Мутации в гене PARK2, ассоциированном с болезнью Паркинсона, сопровождаются разбалансировкой систем программируемой клеточной гибели. Acta Naturae. 2015, №4, 83-86.
8. Долотов О.В., Еремин К.О., Л.А. Андреева, Е.В. Новосадова, К.С. Раевский, Н.Ф. Мясоедов, Гривенников И.А. Семакс предотвращает гибель тирозингидроксилаза-положительных нейронов в смешанной нейроглиальной культуре клеток среднего мозга эмбрионов крысы в модели нейротоксического повреждения 6-гидроксидофамином. Нейрохимия. 2015, 32, № 4, 317–321.
9. Тарантул В.З. Толковый словарь по молекулярной и клеточной биотехнологии. 2015, т. 1, из-во Языки славянской культуры, 984 с.

10. Тарантул В.З. Толковый словарь по молекулярной и клеточной биотехнологии. 2016, т. 2, из-во Языки славянской культуры, 1040 с.
11. Новосадова Е.В., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Л.А. Андреева, О.С. Лебедева, Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф. Изучение влияния альфа-меланоцитстимулирующего гормона на пролиферацию и начальные стадии дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Доклады Академии наук. 2016, 467, № 5, 607–611.
12. Антонов С.А., Новосадова Е.В., Арсеньева Е.Л., Грефенштейн М.А., Зыкова А.А., Кобылянский А.Г., Мануилова Е.С., Гривенников И.А., Иллариошкин С.Н., Мясоедов Н.Ф. Исследование влияния агонистов гамк-рецепторов на дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны. Доклады Академии наук. 2016, 470, № 2, 233-236.
13. Новосадова Е.В., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф. Фибробластоподобные клетки в качестве эффективного фидера для культивирования и получения новых линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Доклады Академии наук. 2016, 470, № 4, 479–482.
14. Антонов С.А., Е.С. Мануилова, О.В. Долотов, А.Г. Кобылянский, Д.Р. Сафина, Гривенников И.А. Воздействие фактора роста нервов на нейрональную дифференцировку эмбриональных стволовых клеток мыши. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016, 162, № 11, 636-641.
15. Gening L.V., Lakhin A.V., Makarova I.V., Nenasheva V.V., Andreeva L.E., Tarantul V.Z. Alterations in synthesis and repair of DNA during the development of loach *Misgurnus fossilis*. J. Develop. Biol., 2016, 4(1):6.
16. Тарантул В.З. и др. В методическом пособии: Реформирование биотехнологического образования на основе болонского процесса (под ред. А.Е. Кузнецова), Лаборатория знаний. 2016, т. 1, 394 с. и т. 2, 388 с.
17. Freitas V.J.F., Melo L.M., Teixeira D.I.A., Bhat M.H., Serova I.A., Lyudmila E. Andreeva L.E., Serov O.L. The Use of Reproductive Technologies to Produce Transgenic Goats. In book: Veterinary Medicine and Science "Insights from Animal Reproduction" (ed. by Carreira R.P.). 2016, 67-84.
18. Козикова Л.В., Полтева Е.А., Макарова И.В., Андреева Л.Е. Пролиферация и гибель клеток рыб - простые и доступные маркеры функционального состояния клеток и жизнеспособности

организма. Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2016, №1, 164-167.

19. Новосадова Е.В., Некрасов Е.Д., Честков И.Б., Сурдина А., Васина Е.М., Богомазова А.Н., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Симонова В.В., Хаспекоев Л.Г., Гривенников И.А., Тарантул В.З., Киселев С.Л., Иллариошкин С.Н. Платформа для изучения молекулярных и клеточных основ патогенеза болезни Паркинсона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Современные технологии в медицине. 2016, 8, №4, 155-164.

20. Арсеньева Е.Л., Гривенников И.А., Мануилова Е.С. Новосадова Е.В., Тарантул В.З. «Способ получения пациент (донор)-специфических фибробласто-подобных клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека». Патент РФ, №2014145167, 2015 г.

21. Новосадова Е.В., Андреева Л.А., Арсеньева Е.Л., Гривенников И.А., С.Н. Иллариошкин, О.С. Лебедева, И.В. Макарова, Мануилова Е.С., Мясоедов Н.Ф., Тарантул В.З. «Применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека для оценки цито- и эмбриотоксических свойств фармакологических соединений». Патент от 21. 09. 2016 г. рег. № 2599847.

ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЫШИ – ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.

А.Г. Кобылянский

Центр клеточных и генных технологий (ЦКГТ)

Целью исследования являлось изучение возможности использования эмбриональных стволовых (ЭС) клеток мыши для тестирования эмбриотоксичных и тератогенных свойств перспективных лекарственных средств на примере пептидов.

Проводилось исследование по выявлению у потенциальных лекарственных соединений пептидной природы (HLDF-6, PGP, RGP, RGPL) и пептидных фармацевтических препаратов (в качестве контроля) Семакс, Селанк и Тиролиберин способности влиять на процессы раннего эмбрионального развития *in vitro*.

Изучалось действие этих веществ на пролиферацию и выживаемость ЭС клеток мыши, а также их производных. Кроме того, оценивалась дифференцировка ЭС клеток мыши в нейральные предшественники, выявляемые по экспрессии специфических маркёров. Совокупная оценка данных параметров позволяет сделать заключение о наличии или отсутствии у анализируемых соединений эмбриотоксических и тератогенных свойств.

Показано, что PGP и PGPL незначительно, но достоверно снижали пролиферативную активность ЭС клеток мыши в дозах 10 и 0,1 мкМ, соответственно. Эти же пептиды в тех же дозах, а также Семакс в дозах 10 и 0,1 мкМ, достоверно увеличивали способность к выживанию (депривация по сыворотке) ЭС клеток мыши. Кроме того, было показано, что испытанные пептиды не оказывали выраженного действия на образование нейральных предшественников из ЭС клеток мыши, а HLDF-6, Селанк, Тиролиберин и на последующую дифференцировку в зрелые типы нейронов. При дифференцировке ЭС клеток в ГАМК-положительные нейроны были выявлены достоверные различия в уменьшении доли ГАМК-положительных нейронов между контролем и в культурах, подвергающимся воздействию 100 мкМ Селанк и Тиролиберин, на 61% и 58%, соответственно, и 7,7 нМ (100 нг/мл) NGF на 87%.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии потенциальных токсических эффектов исследуемых пептидных соединений в эмбриональный и фетальный период развития.

ЭКСПРЕССИЯ ГАМК-А И NMDA РЕЦЕПТОРОВ В ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХСЯ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ (ДА) ЧЕЛОВЕКА.

Рецепторы глутамата и ГАМК обеспечивают соответственно основную часть возбуждающих и тормозящих сигналов в ЦНС человека. Сбалансированная работа этих сигнальных систем необходима для нормального функционирования и выживания нейронов.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния селективных агонистов различных типов ГАМК и глутаматных рецепторов на процесс терминальной дифференцировки ДА-нейронов, получаемых из индуцированных плюрипотентных стволовых (ИПС) клеток человека *in vitro*.

В изучаемых культурах наблюдался гетерогенный характер ответов при аппликации агонистов ГАМК и глутаматных рецепторов. Агонист

ГАМК рецептора мусцимол вызывал транзientное повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция $[Ca^{2+}]_i$ в доле клеток, которая увеличивалась пропорционально возрасту культуры с 5 по 24 дни дифференцировки (ДД). Дифференцировка клеток в присутствии мусцимола приводила к снижению экспрессии тирозингидроксилазы. С 24-30 ДД наблюдались клетки в которых агонисты ГАМК приводили к снижению $[Ca^{2+}]_i$. Аппликация глутамата или NMDA вызывала увеличение $[Ca^{2+}]_i$ после 15 ДД, но только в отдельных клетках.

ОТ-ПЦР анализ показал, что мРНК, кодирующие бета-1 субъединицу ГАМК-А, и Glun2A субъединицу NMDA рецепторов, экспрессируются в клетках в ходе всего периода исследования. В тоже время экспрессия мРНК альфа-1 ГАМК и Glun2B NMDA субъединиц детектировалась только в культурах после 24-30 ДД.

Таким образом, в настоящем исследовании мы показали, что агонисты ГАМК-А-рецепторов способны оказывать влияние на процесс дифференцировки получаемых из ИПС-клеток человека нейрональных предшественников, изменяя пропорцию специфических типов нейронов в популяциях на стадии терминальной дифференцировки. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ГАМК-А-рецептор связан с определенной морфофункциональной характеристикой ДА-нейронов человека, как это описано для широкого спектра нервных клеток животных.

Способность нейротрансмиттеров оказывать влияние на дифференцировку нейронов, изменяя их восприимчивость к специфическим стимулам, следует учитывать при использовании данных клеток в качестве модели в фундаментальных исследованиях и при фармакологическом скрининге. Важно учитывать, что фенотип нейронов определяет их восприимчивость к определенным типам повреждающих воздействий и вследствие этого возможность использования этих клеток (их пригодность) для моделирования специфического патологического процесса. Полученные нами результаты подчеркивают роль рецептора ГАМК-А в определении зрелого фенотипа нейронов человека *in vitro* и указывают на возможность использования специфических агонистов для уточнения процесса направленной дифференцировки ИПС-клеток в специализированные типы нейронов. В дальнейшем представляет интерес провести сравнение воздействия как агонистов, так и антагонистов ГАМК-А-рецепторов на фенотип и численность

образующихся при дифференцировке ИПС-клеток человека в ДА-нейроны.

Публикации Центра клеточных и генных технологий:

1. Антонов С.А., Новосадова Е.В., Арсеньева Е.Л., Грешенштейн М.А., Зыкова А.А., Кобылянский А.Г., Мануилова Е.С., Гривенников И.А., Иллариошкин С.Н., Мясоедов Н.Ф. Исследование влияния агонистов гамк-рецепторов на дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны. Доклады Академии Наук. 2016, т. 470, 2, с. 233-236
2. С.А.Антонов, Е.С.Мануилова, О.В.Долотов, А.Г.Кобылянский, Д.Р.Сафина, И.А.Гривенников Воздействие фактора роста нервов на нейрональную дифференцировку эмбриональных стволовых клеток мыши. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016, 11, с. 636-641.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ПРИРОДНЫХ ПЕПТИДОВ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Н.Ф. Мясоедов

Отдел химии физиологически активных веществ (ОХФВ)

В 2015-2016 годах основным направлением деятельности Отдела являлись структурно-функциональные исследования. Эти исследования включали оптимизацию структуры пептидов на основе ранее развитых подходов, исследование взаимодействия пептидов с мембранами клеток с использованием меченных тритием различных лигандов, исследование изменения транскриптома клеток в норме и при патологии, а также под действием изучаемых лигандов, которое приводит к изменению физиологических свойств, определяющих клинические эффекты пептидов.

Проведен синтез, анализ и исследования физиологического действия новых пептидных последовательностей фрагментов природных пептидов, относящихся к кортиколиберину, обестанину,

лактоферрину, глипролинам, перспективных для создания на их основе новых лекарственных препаратов.

Синтезированы и проанализированы 9 различных пептидов, которые переданы на физиологические исследования. Сравнительное изучение физиологических и фармакологических эффектов простых глипролинов позволило определить структуру пептида 5-охо-Pro-Arg-Pro, перспективную для создания лекарственного препарата для борьбы с метаболическим синдромом. При проведении исследований установлено, что 5-охо-Pro-Arg-Pro активен в отношении глутамат-эргических нейронов и обладает модуляторной активностью в отношении мест специфического связывания глутамата. При физиологических исследованиях показано, что 5-охо-Pro-Arg-Pro в дозе 150 мкг/кг вызывает снижение тревожности. Получены данные об анксиолитическом действии 5-охо-Pro-Arg-Pro. Показано, что 5-охо-Pro-Arg-Pro, введенный многократно интраназально крысам с развившимся метаболическим синдромом повышал антикоагулянтно-фибринолитический фон плазмы крови и снижал агрегацию тромбоцитов.

Синтезирован широкий набор меченных тритием лигандов различных нейрорецепторов (ГАМК, дофаминовых, глутаматных, ваниллоидных, тиролибериновых и др.), охарактеризованы места специфических взаимодействий радиолигандов на плазматических мембранах клеток – мишеней головного мозга крысы. Исследовано влияние пептидов в широком диапазоне концентраций на связывание [3H]GABA, [3H]МК-801, [G-3H]ifenprodil, [3H]L-Glu и [3H]TRH. Исследовано сочетанное действие селанка и этанола, селанка и глицина на связывание [3H]L-Glu и [3H]ifenprodil в системах: ethanol (20 nM) + selank и (10 nM) Gly + selank. Исследовано также влияние пептида на связывание следующих радиолигандов: [3H]CP55,940; [3H]WIN-55,212-2; [3H] Capsaicin(2H); [3H]7-ОН-DPAT; [3H]Dopamine. Синтезирован меченный тритием аналог проглипрола ([3H]PGP). Охарактеризовано 2 места специфического связывания указанного выше радиолиганда на плазматических мембранах клеток головного мозга крысы.

Важную роль в фармакологическом действии пептидов играет протеолитическая устойчивость пептидов. Исследован метаболизм фармакологически важных пептидов, включая идентификацию продуктов их деградации в присутствии индивидуальных ферментов и ферментных комплексов биологических тканей и жидкостей,

выделенных из лабораторных животных. В качестве ферментных систем были использованы лейцинаминопептидаза, карбоксипептидазы Y и B, а также ферментные системы назальной слизи, крови, плазмы крови и мембранной фракции мозга крыс. В качестве исследуемых пептидов были выбраны His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro и тиролиберин. Проведена идентификация основных метаболитов этого пептида и исследована кинетика их образования.

Продолжались исследования острых и отставленных эффектов негативных неонатальных воздействий различной природы. Показано, что неонатальный стресс, вызванный ранней изоляцией детенышей белых крыс, приводит в дальнейшем к увеличению тревожности и депрессивности, нарушению обучения с отрицательным подкреплением. Неонатальное введение антидепрессанта флувоксамина детенышам крыс вызывает возрастание тревожности и нарушение обучения с положительным подкреплением у животных в возрасте 1-2 месяца. В основе зарегистрированных нарушений лежит дисбаланс в системе биогенных аминов мозга крыс. Однократная нормобарическая гипоксия у крысят в возрасте 2 дня приводила в дальнейшем к гиперактивности и когнитивным нарушениям у взрослых крыс. Хроническое введение препарата семакса в значительной степени нормализует эмоциональное состояние, когнитивные функции и биохимические показатели у животных в использованных моделях неонатальных патологий.

Важным направлением работ Отдела является доведение лекарственных препаратов до клиники. В 2016 году в рамках I фазы клинических исследований проведены фармакокинетические исследования пептида PGPL (торговое название глипропол) образцов плазмы крови добровольцев. Полученные при проведении исследований данные указывают на то, что после введения тетрапептид PGPL быстро всасывается в кровь (T_{max} – 15 мин), достигая концентрации – около 1.4 нг/мл (C_{max}). Выводится PGPL из организма с умеренной скоростью, время полувыведения ($T_{1/2}$) составляет около 50 мин. То есть полное выведение глипропола можно ожидать примерно через 4 ч. С учетом полученных данных для увеличения фармакологических эффектов препарата «Глипропол, капли назальные 0,2%» можно рекомендовать двух- или трехкратный прием препарата с интервалом 6-12 ч. Дальнейшие исследования фармакокинетики глипропола в клинике должны быть тесно связаны с

установлением безопасных и эффективных доз при одно- и многократном применении.

УЧАСТИЕ СИСТЕМЫ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ КАРДИОМИОЦИТОВ НА ГИПЕРГЛИКЕМИЮ

С.И. Шрам

Сектор нейрофармакологии ОХФАВ

Известно, что система поли(АДФ-рибозил)ирования белков выполняет важную роль в поддержании стабильности генома, реорганизации хроматина, регуляции экспрессии генов и других процессах, направленных на поддержание высокой жизнеспособности и нормального функционирования клетки в течение всей её жизни. Кроме того эта система, по-видимому, является важным компонентом стресс-индуцированных защитных и адаптивных реакций клетки на внешние воздействия, а в определенных условиях она может быть вовлечена в патогенез некоторых заболеваний, связанных с развитием воспаления и окислительного стресса.

С использованием культур дифференцированных в кардиомиоциты клеток H9c2 (кардиомиобласты крысы) нами было исследована роль системы поли(АДФ-рибозил)ирования белков в патологических реакциях кардиомиоцитов на длительное воздействие гипергликемии - одного из основных патологических факторов диабетической кардиомиопатии. Было показано, что длительная гипергликемия (1-10 сут, Glc - 30 мМ) приводит к развитию хронического окислительного стресса, который, в свою очередь, запускает целый ряд патологических реакций, приводящих к снижению жизнеспособности клеточной популяции, гибели клеток и клеточному старению. Нейтрализация образующихся в условиях гипергликемии активных форм кислорода антиоксидантом *N*-ацетилцистеином и фармакологическое ингибирование поли(АДФ-рибоза)-полимеразы-1 практически полностью предотвращали вызываемые гипергликемией апоптотическую гибель и старение кардиомиоцитов H9c2, что свидетельствует о ключевой роли окислительного стресса и системы поли(АДФ-рибозил)ирования белков в повреждении и старении кардиомиоцитов, в условиях

данной экспериментальной модели. Было обнаружено, что гипергликемия вызывает устойчивое увеличение базального уровня поли(АДФ-рибозы) в культивируемых кардиомиоцитах H9c2. При этом содержание поли(АДФ-рибозы) в сенесцентных клетках, образующихся как в условиях нормогликемии, так и гипергликемии, оказалось значительно выше чем в клетках, сохраняющих нормальный фенотип.

Таким образом нами было установлено, что хронический окислительный стресс и активация системы поли(АДФ-рибозил)ирования белков являются неотъемлемыми атрибутами стрессорных патологических реакций кардиомиоцитов на гипергликемическое воздействие. В дальнейшем мы попытаемся выяснить, насколько важным для функционирования сенесцентных клеток является присущее ей более интенсивное (по сравнению с нормальными клетками) протекание процесса поли(АДФ-рибозил)ирования белков.

Публикации Отдела химии физиологически активных веществ (зарубежные):

1. Vladimir V. Bezuglov, Mikhail G. Akimov, Natalia M. Gretskeya, Alexander M. Surin, Vsevolod G. Pinelis, Stanislav I. Shram, Tatiana V. Vyunova, Konstantin V. Shevchenko, Ludmila A. Andreeva and Nikolaj F. Myasoedov. The Study of the Neurotropic Peptides Role in Cell Responses Regulation //Horizons in Neuroscience Research. 2015, V. 21, 151-170. (Обзор).
2. Shyphyna M. S., Veselovsky N. S., Myasoedov N. F., Shram S. I., Fedulova S.A. Effect of peptides semax on synaptic activity and short-term plasticity of glutamatergic synapses of co-cultured dorsal root ganglion and dorsal horn neurons//Fiziologichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine). 2015, 61, 4,48-55.
3. Myasoedov N.F., Lyapina L.A, Grigorjeva M.G., Obergan T.Y., Shubina T.A., Andreeva L.A. Mechanisms for glyproline protection in hypercholesterolemia// Pathophysiology. 2016, 23(16), 27-33.
4. Bakaeva ZV, Sangadzhieva AD, Tani S, Myasoedov NF, Andreeva LA, Torshin VI, Wallace JL, Tanaka T. Glyprolines exert protective and repair-promoting effects in the rat stomach: potential role of the cytokine GRO/CINC-1//J Physiol Pharmacol. 2016 Apr; 67(2):253-60.

5. Zolotarev Y.A., Kovalev G.I., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Dadayan A.K., Kondrakhin E.A., Vasileva E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., Lipkin V.M., Myasoedov N.F. Anxiolytic activity of the neuroprotective peptide HLDF-6 and its effects on brain neurotransmitter systems in BALB/c and C57BL/6 mice//*J Psychopharmacol.* 2016 Sep; 30(9):922-935.
6. Bogachouk A.P., Storozheva Z.I., Solovjeva O.A., Sherstnev V.V., Zolotarev Y.A., Azev V.N., Rodionov I.L., Surina E.A., Lipkin V.M. Comparative study of the neuroprotective and nootropic activities of the carboxylate and amide forms of the HLDF-6 peptide in animal models of Alzheimer's disease//*J Psychopharmacol.* 2016 Jan; 30 (1):78-92.
7. Arthur T. Kopylov, Nikolay F. Myasoedov, Alexander K. Dadayan, Victor G. Zgoda, Alexei E. Medvedev and Yurii A. Zolotarev. Use of deuterium labeling by high-temperature solid-state hydrogen-exchange reaction for mass spectrometric analysis of bradykinin biotransformation//*Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2016, 30, 1283–1294.
8. Razzhivina I.A., Badun G.A., Chernysheva M.G., Garshev A.V., Shevchenko V.P., Shevchenko K.V., Nagaev I.Yu., Shchepina N.E. Hydrogen spillover through a gas phase // *Mendeleev Communications.* 2016. V.26. Issue 1. P.59-60.
9. Filatova E., Shadrina M., Kolomin T., Andreeva L., Myasoedov N., Slominsky P. Synthetic Peptides Affect the Expression of Gdnf and Gdnf Receptors in Rats with 6-OHDA-Induced PD-Like Parkinsonism, *World Journal of Neuroscience.* 2016, V.6. P. 243-259.
10. Volkova A., Shadrina M., Kolomin T., Andreeva L., Limborska S., Myasoedov N., Slominsky P. Selank Administration Affects the Expression of Some Genes Involved in GABAergic Neurotransmission// *Frontiers in Pharmacology.* 2016, Feb 18; 7:31.
11. Medvedeva Ekaterina V., Dmitrieva Veronika G., Stavchansky Vasily V., Povarova Oksana V., Limborska Svetlana A., Myasoedov Nikolay F., Dergunova Lyudmila V.. // Semax-induced changes in growth factor mRNA levels in the rat brain on the third day after ischemia // *Int J Pept Res Ther.* 2016, V.22, 197-209.

В российских журналах - 19 статья

В иностранных журналах - 11 статей

Получено патентов российских - 4

ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ, ОПУХОЛЕВЫЕ МОДЕЛИ, ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АГЕНТЫ

С.В. Костров

Лаборатория белковой инженерии
Отдела молекулярно-генетических основ биотехнологии и
белковой инженерии

В отчетный период в лаборатории продолжались исследования посвященные поиску новых агентов противораковой генной терапии и молекулярных маркеров онкологических заболеваний. Основными направлениями этих исследований были изучение цитотоксического действия вирусных протеаз и разработка на их основе искусственных токсинов, анализ функционирования пробелокконвертаз в опухолях человека, создание векторных систем для экспрессии терапевтических генов и разработка методов оценки их эффективности, адаптация животных моделей для работ, которые осуществляются в лаборатории. Кроме того, были продолжены структурно-функциональные исследования протеализинподобных протеаз и углеводсвязывающих модулей гликозидаз.

Важным итогом отчетного периода является то, что в лаборатории начаты работы по использованию рыб *Danio rerio* в качестве модели для анализа биологически активных соединений, в том числе противоопухолевых. В настоящее время проводится культивирование линий *Danio rerio* дикого типа АВ, Tg(ath5:GFP), Tg(kdr:EGFP), Tg(fli1:GFP/gata1:dsRed), а также линии оптически прозрачных рыб "casper". Осуществляются работы по ксенотрансплантации генетически маркированных опухолей человека в организм *Danio rerio*.

Основные результаты получены в ходе исследований протеазы ЗС вируса гепатита А человека (ЗСрго). Получен набор белков – вариантов протеазы, несущих белоктрансдуцирующие и эндосомолитические модули, и изучена их способность проникать в клетки человека в культуре и вызывать их гибель. Также получен набор генетических конструкций, обеспечивающих экспрессию в клетках человека секреторных вариантов ЗСрго, в том числе несущих белоктрансдуцирующие и эндосомолитические модули. Изучено опосредованное данными конструкциями цитотоксическое действие на клетки человека в культуре. Главным итогом этой части работы

является демонстрация способности ЗСрго опосредовать эффект свидетеля – гибель клеток, которые не несут гена протеазы, но находятся с клетками, экспрессирующими ЗСрго, в той же культуре. При этом показано, что цитотоксическим действием обладает также среда, в которой культивировались клетки, экспрессирующие ЗСрго. Таким образом, обнаруженный эффект свидетеля не зависит от межклеточных контактов. Описанное явление обнаружено впервые и, вероятно, отражает ранее неизвестную сторону взаимодействия вирусов с организмом-хозяином. Найденные свойства ЗСрго открывают новые возможности применения гена этого фермента в генной терапии онкологических заболеваний.

Публикации лаборатории белковой инженерии:

1. Shubin A.V., Demidyuk I.V., Lunina N.A., Komissarov A.A., Roschina M.P., Leonova O.G., Kostrov S.V. Protease 3C of hepatitis A virus induces vacuolization of lysosomal/endosomal organelles and caspase-independent cell death. BMC Cell Biology. 2015, 16:4.
2. Safina D.R., Surin A.M., Pinelis V.G., Kostrov S.V. Effect of neurotrophin-3 precursor on glutamate-induced calcium homeostasis deregulation in rat cerebellum granule cells. J Neurosci Res. 2015, 93(12):1865-73.
3. Demidyuk I.V., Gromova T.Yu., Kostrov S.V. The propeptide is required for in vivo formation of active protealysin. Protein and Peptide Letters. 2015, 22(6):509-513.
4. Gasanov E.V., Rafieva L.M., Korzh V.P. BDNF-TrkB axis regulates migration of the lateral line primordium and modulates the maintenance of mechanoreceptor progenitors. PLoS One. 2015, 10(3):e0119711.
5. Koeck D.E., Ludwig W., Wanner G., Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H. *Herbinix hemicellulosilytica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. Int J Syst Evol Microbiol. 2015, 65(8):2365-71.
6. Koeck D.E., Koellmeier T., Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H. Differences in biomass degradation between newly isolated environmental strains of *Clostridium thermocellum* and heterogeneity in the size of the cellulosomal scaffoldin. Syst Appl Microbiol. 2015, 38(6):424-32.
7. Koeck D.E., Maus I., Wibberg D., Winkler A., Zverlov V.V., Liebl W., Pühler A., Schwarz W.H., Schlüter A. Draft genome sequence of *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55 T, a new thermophilic cellulose degrading

bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. J Biotechnol. 2015, 214:59-60.

8. Kislitsyn Y.A., Samygina V.R., Dvortsov I.A., Lunina N.A., Kuranova I.P., Velikodvorskaya G.A. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the family 54 carbohydrate-binding module from laminarinase (β -1,3-glucanase) Lic16A of *Clostridium thermocellum*. Acta Cryst. 2015, 71(2):217-220.

9. Koeck D.E., Mechelke M., Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H. *Herbivorax saccincola* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic, anaerobic, thermophilic bacterium isolated via in sacco enrichments from a lab scale biogas reactor. Int J Syst Evol Microbiol. 2016, 66(11):4458-4463.

10. Koeck D.E., Hahnke S., Zverlov V.V.. *Herbinix luporum* sp. nov., a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. Int J Syst Evol Microbiol. 2016, 66(10):4132-4137.

11. Koeck D.E., Maus I., Wibberg D., Winkler A., Zverlov V.V., Liebl W., Pühler A., Schwarz W.H., Schlüter A. Complete Genome Sequence of *Herbinix luporum* SD1D, a New Cellulose-Degrading Bacterium Isolated from a Thermophilic Biogas Reactor. Genome Announc. 2016, 4(4): e00687-16.

12. Koeck D.E., Maus I., Wibberg D., Winkler A., Zverlov V.V., Liebl W., Pühler A., Schwarz W.H., Schlüter A. Draft Genome Sequence of *Propionispora* sp. Strain 2/2-37, a New Xylan-Degrading Bacterium Isolated from a Mesophilic Biogas Reactor. Genome Announc. 2016, 4(3):e00609-16.

13. Shubin A.V., Demidyuk I.V., Komissarov A.A., Rafieva L.M., Kostrov S.V. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. Oncotarget. 2016, 7(34):55863-55889.

14. Rafieva L.M., Gasanov E.V. Neurotrophin propeptides: biological functions and molecular mechanisms. Current Protein Peptide Science. 2016, 17(4):298-305.

15. Комиссаров А.А., Карасева М.А., Сафина Д.Р., Рощина М.П., Беднова О.П., Казаков А.А., Демкин В.В., Демидюк И.В. Сравнительная оценка эффективности экспрессии трансгена в составе модельных генетических конструкций разной структуры. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016, 3:115-120.

16. Крестьянова И.Н., Сахибгараева Л.Ф., Березина О.В., Рыков С.В., Завьялов А.В., Зверлов В.В., Яроцкий С.В. Характеристика грибных штаммов-продуцентов термостабильных ксиланоглюканаз из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов.

Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016, 3:109-114.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ БАКТЕРИЙ – ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И ЦИАНОТОКСИНА БМАА

И.А. Хмель, О.А. Кокшарова

Лаборатория регуляции экспрессии генов микроорганизмов

Тематика исследований Лаборатории в 2015-2016 гг. включала следующие направления: 1) летучие органические соединения, выделяемые бактериями, механизмы их действия на различные биологические объекты, роль в коммуникации бактерий; 2) цианотоксин БМАА и его регуляторная роль в клетках цианобактерий; 3) биогенез наночастиц металлов и их взаимодействие с бактериями.

1. Бактерии и другие микроорганизмы синтезируют большое количество разнообразных летучих органических соединений (ЛОС). Эти соединения могут проявлять антимикробное действие, влиять на рост растений, насекомых, нематод, могут действовать в качестве сигнальных молекул для коммуникации нового типа между различными организмами («infochemicals»). Изучение ЛОС открывает новые аспекты антагонистических отношений между микроорганизмами и их взаимодействия с высшими организмами. ЛОС, выделяемые микроорганизмами, являются важным источником новых химических веществ, которые могут быть использованы в медицине, биотехнологии, сельском хозяйстве. Однако экологическая и функциональная роль этих соединений, механизмы их биосинтеза и действия на микроорганизмы и растения, генетическая регуляция синтеза изучены очень слабо. Работы в этом направлении еще далеки от серьезного фундаментального уровня.

С использованием lux-биосенсоров, содержащих клонированные промоторы генов *katG*, *soxS* and *oxyS*, участвующих в защите клеток от окислительного стресса, было показано, что действие ЛОС, синтезируемых штаммами *Pseudomonas* и *Serratia* - кетонов (2-нонанона, 2-гептанона и 2-ундеканона) и

диметилдисульфида (ДМДС), 1) не вызывает окислительный стресс и 2) снижает экспрессию генов, индуцируемых окислительным стрессом, т.е. в присутствии ЛОС клетки бактерий становятся более чувствительны к окислительному стрессу. Была продолжена работа по изучению транспозонных мутантов цианобактерии *Synechococcus*, устойчивых к действию кетонов. У мутантов, устойчивых к 2-нонанону, определены гены, инактивированные инсерциями транспозона. Локализация инсерций транспозонов в генах, кодирующих муреин-пептид-лигазу, которая участвует в рециклизации муреина в процессе биогенеза клеточной стенки цианобактерий, и гене, кодирующем ABC транспортер, сходный с транспортерами, определяющими устойчивость к органическим растворителям, подтверждена получением мутантов с соответствующими нокаутированными генами. Исследуются мутанты, устойчивые к другим ЛОС.

Проводится работа по протеомному анализу экспрессии белков при действии 2-нонанона на модели мха *Physcomitrella patens* (совместно с сотрудниками лаборатории протеомики, рук. В.М. Говорун, Институт биоорганической химии РАН). Идентифицированы белки с измененным уровнем экспрессии по сравнению с контролем (без действия 2-нонанона), среди них белки, относящиеся к различным функциональным группам. Полученные данные свидетельствуют о плейотропном действии 2-нонанона.

Было продолжено изучение действия летучих соединений, образуемых бактериями, на растения *Arabidopsis thaliana*. Показано, что эффект общего пула летучих соединений зависит от среды, на которой выращиваются бактерии, что, по-видимому, определяет состав и количество синтезируемых ЛОС. Получены данные о ингибировании ЛОС прорастания семян.

2. Среди молекул с сигнальным действием большое внимание привлекают вторичные метаболиты, образуемые фотоавтотрофными прокариотами - цианобактериями. Особый интерес представляет нейротоксичная небелковая аминокислота БМАА (бета-N-метиламин-L-аланин), которая связывается с глутаматными рецепторами в мозге человека и животных, приводя к тяжелым нейро-дегенеративным заболеваниям. С целью изучения роли БМАА в метаболизме самих цианобактерий мы использовали модельный штамм нитчатой азотфиксирующей цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120. Показано, что БМАА репрессирует образование гетероцист (специализированных

клеток, в которых происходит фиксация атмосферного азота) и синтез фермента нитрогеназы в процессе азотфиксации в клетках цианобактерии. Действие БМАА приводит к изменению экспрессии генов, продукты которых вовлечены в азотный метаболизм и клеточную дифференцировку цианобактерии.

3. В рамках совместного российско-индийского проекта проведены работы по биогенезу наночастиц серебра (НЧС) с использованием экстрактов 25 растений, обитающих в России. Для дальнейшего изучения были отобраны 8 экстрактов растений (ЭР), которые способствовали образованию наибольшего количества НЧС. С помощью методов атомно-силовой и электронной микроскопии показано, что ЭР обуславливают образование НЧС различного размера и различной формы. Полученные НЧС оказывали убивающее действие на клетки бактерий и подавляли образование биопленок.

**Публикации Лаборатории регуляции экспрессии генов
микроорганизмов:**

1. Karaushu, I. V. Lazebnaya, T. R. Kravzova, N. A. Vorobey, O. E. Lazebny, D. A. Kiriziy, O. P. Olkhovich, N. Yu. Taran, S. Ya. Kots, A. A. Popova, E. Omarova, and O. A. Koksharova Biochemical and Molecular Phylogenetic Study of Agriculturally Useful Association of a Nitrogen-Fixing Cyanobacterium and Nodule Sinorhizobium with *Medicago sativa* L. E. V. BioMed Research International Volume. 2015, Article ID 202597, 16 pages.
2. Rtimi S., Kiwi J., Pulgarin C., Sanjines R., Bensimon M., Khmel I., Nadtochenko V. Innovative photocatalyst (FeOx-TiO₂): transients induced by femtosecond laser pulse leading to bacterial inactivation under visible light. RSC Advances. 2015. v. 5. № 123. p. 101751-101759.
3. Плюта В.А, Липасова В.А., Кокшарова О. А., Веселова М.А., Кузнецов А.Е., Хмель И.А. Эффект введения гетерологичного гена ацил-гомосеринлактоназы (*aiiA*) на свойства штамма *Burkholderia ceposepacia* 370. Генетика. 2015, т. 51. №8. с. 864-872.
4. А. В. Ганнесен, М. В. Журина, М. А. Веселова, И. А. Хмель, В. К. Плакунов. Регуляция процесса формирования биопленок *Pseudomonas chlororaphis* в системе *in vitro*. Микробиология. 2015. т. 84, № 3, с. 281-290.

5. Veselova M.A., Romanova Yu.M., Lipasova V.A., Koksharova O.A., Zaitseva Yu.V., Chernukha M.U., Gintsburg A.L., Khmel I.A. The effect of mutation in the *clpX* gene on the synthesis of N-acyl-homoserine lactones and other properties of *Burkholderia cenocepacia* 370. Microbiol. Research. 2016, 186, 90-98.
6. Z. Jia, V. Nadtochenko, M. Radzig, I. Khmel, G. Zavilgelsky, R. Azouani, C. Mielcarek, M. Ben Amar, M. Traore and A. Kanaev. Antibacterial activity of monolayer nanoparticulate AgN-(titanium-oxo-alkoxy) coatings. Mechanics & Industry. 2016, 17, 504.
7. Plyuta V., Lipasova V., Popova A., Koksharova O., Kuznetsov A., Szegedi E., Chernin L., Khmel I. Influence of volatile organic compounds emitted by *Pseudomonas* and *Serratia* strains on *Agrobacterium tumefaciens* biofilms. APMIS. 2016, 124:586-94.
8. М. А. Радциг, О. А. Кокшарова, В. А. Надточенко, И. А. Хмель. Получение наночастиц золота методом биогенеза с использованием бактерий. Микробиология. 2016, т. 85, № 1, с. 42–49.
9. А.А. Попова , О.А. Кокшарова. Нейротоксичная небелковая аминокислота – N-метиламин-L-аланин и ее роль в биологических системах. Биохимия. 2016, т. 81, в. 8, с. 1023 – 1035.
10. А.А.Гулин, О. А. Кокшарова, А.А. Попова, И. А. Хмель, А.А. Астафьев, А.М.Шахов, В. А. Надточенко. Визуализация серебра в клетках цианобактерий *Anabaena* sp PCC 7120 методами времяпролетной масс-спектропии вторичных ионов и двухфотонной люминесцентной микроскопии. Российские нанотехнологии. 2016, т. 11, N 5-6, с. 72-74.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА: МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ПОПУЛЯЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

С.А. Лимборская

Отдел молекулярных основ генетики человека (ОМОГЧ)

В настоящее время важным подходом в изучении работы генома в клетках при различных условиях является транскриптомный анализ. Он активно используется для исследования особенностей функционирования нервных клеток в норме, при воздействии лекарственных препаратов и при патологических состояниях, включая ишемию. За отчетный период нами было проведено изучение геной

экспрессии в мозге крыс в условиях экспериментальной ишемии и при воздействии пептидных препаратов. Под действием пептида семакса обнаружена стимуляция генов иммунного ответа, а также изменение экспрессии генов, продукты которых вовлечены в сигнальные пути и разнообразные биологические процессы.

Было продолжено изучение структурно-функциональной организации жизненно важного гена сфингомиелинсинтазы 1 человека, активно функционирующего в клетках головного мозга. Выявлены новые транскрипты гена, в том числе принимающие участие в рекурсивном сплайсинге длинных интронов. Обнаружены 13 циклических РНК, в образовании которых участвуют регуляторные участки гена. Показано, что изучаемый ген представляет собой сложную генетическую структуру, кодирующую белок и обеспечивающую регуляцию своего функционирования в различных условиях.

В области популяционной геномики была проведена работа в которой показано, что возникновение делеционных мутаций, целиком удаляющих последовательность гена, в значительной степени зависит от генетического контекста в ближайшем и отдаленном окружении данного гена.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РИСКА МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

П.А. Сломинский

Лаборатория молекулярных основ наследственных
заболеваний ОМОГЧ

Несмотря на достигнутые в последние годы успехи в изучении роли генетических факторов в патогенезе семейной и спорадической формы болезни Паркинсона (БП) и выявление ряда важных звеньев молекулярного патогенеза этого заболевания, остается нерешенным ряд ключевых вопросов. Так, в настоящее время не ясно, почему при БП преимущественно поражаются дофаминэргические нейроны нигро-стриатного пути, хотя основные, связанные с развитием БП патологические процессы, не ограничены этим типом нейронов. Для выявления таких

механизмов может быть использован комплексный подход, сочетающий анализ различных моделей БП (клеточных, генетических, токсических) с анализом биоматериала от пациентов с БП. Сопоставление получаемых при таком анализе результатов позволит лучше понять этиопатогенез заболевания и на этой основе подойти к ранней диагностике БП и разработке новых методов терапии заболевания. Эти же модели могут быть использованы и для поиска новых методов ранней диагностики и лечения БП. Нами проведен такой сравнительный анализ изменений транскриптома в различных отделах мозга и периферической крови мышей с токсической МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) моделью заболевания на досимптомной и ранней симптомной стадиях развития патологического процесса, транскриптома клеток периферической крови пациентов с ранней стадией БП и здоровых лиц и транскриптома периферической крови дискордантных по БП монозиготных близнецов. В итоге было показано, что уже на ранних стадиях развития патологического процесса изменяется экспрессия генов, связанных с процессами везикулярного транспорта. Выявленные при таком сравнительном анализе гены рассматриваются нами как потенциальные РНК биомаркеры доклинической стадии БП. Анализ их экспрессии к настоящему времени позволил идентифицировать три гена, уровень экспрессии которых может рассматриваться как маркер БП.

С целью поиска новых генетических детерминант БП ведутся работы по секвенированию кандидатных генов БП и NGS секвенированию пациентов с БП. Выявлен ряд генетических вариантов, которые могут быть связаны с развитием патологического процесса при семейных формах заболевания.

**Публикации Отдела молекулярных основ генетики
человека:**

1. Alieva Anelya Kh., Filatova Elena V., Karabanov Aleksey V., Illarioshkin Sergey N., Slominsky Petr A., Shadrina Maria I. Potential Biomarkers of the Earliest Clinical Stages of Parkinson's Disease. Parkinsons Dis. 2015, 2015:294396.

2. Alieva Anelya Kh, Filatova Elena V, Karabanov Aleksey V, Illarioshkin Sergey N., Limborska Svetlana A., Shadrina Maria I., Slominsky Petr A. miRNA expression is highly sensitive to a drug therapy in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2015 Jan;21(1):72-74.
3. Filippenkov IB, Sudarkina OY, Limborska SA, Dergunova LV. Circular RNA of the human sphingomyelin synthase 1 gene: Multiple splice variants, evolutionary conservatism and expression in different tissues. *RNA Biol.* 2015 Sep 2; 12(9):1030-42.
4. O.Yu. Sudarkina, I.B. Filippenkov, I.B. Brodsky, S. A. Limborska, L.V. Dergunova Comparative analysis of sphingomyelin synthase 1 gene expression at the transcriptional and translational levels in human tissues. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2015 Aug; 406 (1-2):91-9.
5. Bulik-Sullivan BK, Loh PR, Finucane HK, Ripke S, Yang J, ... Khrunin AV, ... Limborska SA, ... Slominsky PA, ... Patterson N, Daly MJ, Price AL, Neale BM. LD Score regression distinguishes confounding from polygenicity in genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2015, 47(3):291-5.
6. Vilhjálmsson BJ, Yang J, Finucane HK, Gusev A, ... Khrunin AV, ... Limborska SA, ... Slominsky PA, ... Patterson N, Price AL. Modeling Linkage Disequilibrium Increases Accuracy of Polygenic Risk Scores // *Am J Hum Genet.* 2015, 97(4):576-92.
7. Loh PR, Bhatia G, Gusev A, Finucane HK, Bulik-Sullivan BK, ... Khrunin AV, ... Limborska SA, ... Slominsky PA, ... O'Donovan MC, Neale BM, Patterson N, Price AL. Contrasting genetic architectures of schizophrenia and other complex diseases using fast variance-components analysis // *Nat Genet.* 2015, 47(12):1385-92.
8. Сударкина О.Ю., Дергунова Л.В. Получение белкового экстракта тканей, обогащенного сфингомиелинсинтазой 1. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2015, 33(2):38-41.
9. А. В. Рожкова, И. Б. Филиппенков, О. Ю. Сударкина, С. А. Лимборская, Л. В. Дергунова Альтернативные промоторы, локализованные в интронах гена *SGMS1*, участвуют в регуляции его экспрессии в тканях человека. *Молекулярная биология.* 2015, том 49 №2 с. 325-333.
10. Сломинский П.А., Тупицына Т.В., Калиниченко Д.Н. Связь одностороннего и двустороннего уролитиаза с генетическими факторами. *Экспериментальная и клиническая урология.* 2015. № 2. С. 68-71.
11. Ekaterina V. Medvedeva, Veronika G. Dmitrieva, Vasily V. Stavchansky, Oksana V. Povarova, Svetlana A. Limborska, Nikolay F. Myasoedov,

Lyudmila V. Dergunova. Semax-induced changes in growth factor mRNA levels in the rat brain on the third day after ischemia. *Int J Pept Res Ther.* 2016, V. 22, № 2, pp 197–209.

12. Shulskaya MV, Shadrina MI, Fedotova EY, Abramychева NY, Limborska SA, Illarioshkin SN, Slominsky PA. Second mutation in PARK2 is absent in patients with sporadic Parkinson's disease and heterozygous exonic deletions/duplications in parkin gene. *Int J Neurosci.* 2016 Nov 16:1-4.

13. Volkova A, Shadrina M, Kolomin T, Andreeva L, Limborska S, Myasoedov N, Slominsky P. Selank Administration Affects the Expression of Some Genes Involved in GABAergic Neurotransmission. *Front Pharmacol.* 2016. Feb 18;7:31.

14. Shadrina MI, Shulskaya MV, Klyushnikov SA, Nikopencius T, Nelis M, Kivistik PA, Komar AA, Limborska SA, Illarioshkin SN, Slominsky PA. ITPR1 gene p.Val1553Met mutation in Russian family with mild Spinocerebellar ataxia. *Cerebellum Ataxias.* 2016 Jan 13;3:2.

15. Bigdeli TB, Ripke S, Bacanu SA, Lee SH, Wray NR, ... Khrunin AV, ... Limborska SA, ... Slominsky PA, ... Sullivan PF, O'Donovan MC. Genome-wide association study reveals greater polygenic loading for schizophrenia in cases with a family history of illness. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2016; 171B(2):276-89.

16. Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, Davis A, Hammond TR, ... Khrunin AV, ... Limborska SA, ... Slominsky PA, ... Daly MJ, Carroll MC, Stevens B, McCarroll SA. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature.* 2016; 530(7589):177-83.

17. Franke B, Stein JL, Ripke S, Anttila V, Hibar DP, ... Khrunin AV, ... Limborska SA, ... Slominsky PA, ... O'Donovan MC, Thompson PM, Neale BM, Medland SE, Sullivan PF. Genetic influences on schizophrenia and subcortical brain volumes: large-scale proof of concept. *Nat Neurosci.* 2016; 19(3):420-31.

18. Mehta D, Tropf FC, Gratten J, Bakshi A, Zhu Z, Bacanu SA, ... Khrunin A, ... Limborska S, ... Tooney PA, Waddington J, Weinberger DR, Weiser M, Wu JQ. Evidence for Genetic Overlap Between Schizophrenia and Age at First Birth in Women. *JAMA Psychiatry.* 2016;73(5):497-505.

19. Khrunin AV, Filippova IN, Aliev AM, Tupitsina TV, Slominsky PA, Limborska SA. GSTM1 copy number variation in the context of single nucleotide polymorphisms in the human GSTM cluster. *Mol Cytogenet.* 2016, 9:30.

20. Bondarenko EA, Shadrina MI, Grishkina MN, Druzhkova TA, Akzhigitov RG, Gulyaeva NV, Guekht AB, Slominsky PA. Genetic Analysis of *BDNF*,

GNB3, MTHFR, ACE and APOE Variants in Major and Recurrent Depressive Disorders in Russia. Int J Med Sci. 2016 Dec 8; 13(12):977-983.

21. Дмитриева В.Г., Ставчанский В.В., Поварова О.В., Скворцова В. И., Лимборская С.А., Дергунова Л.В. Влияние ишемии на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в структурах мозга крыс вне очага повреждения, включая противоположное полушарие. Молекулярная биология. 2016, Т. 50. №5. С. 775 – 784.

22. Филиппенков И.Б., Дергунова Л.В., Рожкова А.В., Сударкина О.Ю., Лимборская С.А. Особенности структуры и экспрессии гена сфингомиелинсинтазы 1 (SGMS1) человека. Цитология. 2016, Т. 58. №4. С. 267–271.

23. Вьюнова Т.В., Медведева Е.В., Андреева Л.А., Дергунова Л.В., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф. *Возможная* роль транстиретина в биологическом механизме пептидной нейропротекции. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016, №3. С. 104 -109.

24. Кимельфельд Е.И., Кольцова Е.А., Петрова Е.А., Тупицына Т.В., Сломинский П.А., Лимборская С.А. Гипергомоцистеинемия и C677T полиморфизм гена MTHFR у пациентов с ишемическим инсультом в возрасте до 50 лет. Consilium Medicum. 2016, Т. 18. № 2. С. 13-17.

25. Дмитриева В.Г., Ставчанский В.В., Поварова О.В., Скворцова В. И., Лимборская С.А., Дергунова Л.В. Влияние ишемии на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в структурах мозга крыс вне очага повреждения, включая противоположное полушарие. Молекулярная биология. 2016, Т. 50. №5. С. 775 – 784.

26. Филиппенков И.Б., Дергунова Л.В., Рожкова А.В., Сударкина О.Ю., Лимборская С.А. Особенности структуры и экспрессии гена сфингомиелинсинтазы 1 (SGMS1) человека. Цитология. 2016, Т. 58. №4. С. 267–2.

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЙ КОМПОНЕНТОВ МИКРОБИОТ ЧЕЛОВЕКА

В.В. Демкин

Лаборатория молекулярной диагностики

Микробиота влагалища представляет собой сложный комплекс микроорганизмов, которые находятся в сложных и тесных взаимоотношениях, как между собой, так и с макроорганизмом.

Качественный и количественный состав вагинальных микроорганизмов различается среди индивидуумов, а также изменяется в течение жизни женщины под действием различных эндо- и экзогенных факторов. Считается, что основным стабилизирующим фактором вагинальной экосистемы являются лактобактерии. Однако, данные о количественной представленности лактобациллярного компонента и его видовой структуре существенно различаются в работах различных авторов. Это может быть связано как с демографическими особенностями обследуемого контингента, так и с методическими различиями исследований, проводимых в разных научных группах.

В лаборатории молекулярной диагностики в предыдущие годы на основе полногеномного анализа был разработан ряд диагностических методов для определения и количественной оценки основных бактериальных компонентов вагинальной микробиоты на основе метода ПЦР в реальном времени, в том числе уникальный метод количественного определения тотального количества вагинальных лактобактерий с идентификацией 6-ти основных видов. В отчетном периоде проведены исследования популяционного и видового разнообразия лактобактерий в вагинальных микробиотах российских женщин. Проведена калибровка и валидация тест-систем, изучены особенности количественной оценки при тестировании одновременно двух матриц, проведено нормирование количественных показателей относительно общего содержания бактерий.

Обнаружено, что при использовании нормированных показателей количество вагинальных лактобактерий среди различных индивидуумов имеет распределение близкое к нормальному с медианой в области 20% по отношению к общему количеству бактерий. Эти данные позволяют предположить, что вопреки сложившемуся мнению, лактобактерии являются не единственным доминирующим компонентом в вагинальной микробиоте. Какие другие микроорганизмы могут претендовать на роль «партнеров» лактобактерий в деле поддержания здорового микробиоценоза влагалища предстоит еще выяснить.

Видовое разнообразие лактобактерий в вагинальных микробиотах исчерпывалось практически 4-мя видами, среди которых чаще всего определяли *L.iners*, *L.crispatus*, *L.jenseni*, *L.jonsoni*/*L.gasseri*. Один раз была выявлена *L.acidophilus*. В процентном отношении

наиболее часто выявлялись *L.iners* и *L.crispatus*, но конкретные показатели значительно колебались для различных выборок. От 10 до 20% лактоположительных образцов содержали от 2 до 3-х видов лактобактерий.

Полученные результаты свидетельствуют, что нормальное состояние микробиоценоза влажной среды не может быть сведено к простому доминированию лактобактерий и требует поиска дополнительных критериев.

Публикации Лаборатории молекулярной диагностики:

1. Светлова Е.В., Слепова О.С., Денисова Е.В., Ковалева Л.А., Еремеева Е.А., Макаров П.В., Кугушева А.Э., Вахова Е.С., Андрюшин А.Е., Демкин В.В. Серологическая диагностика инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6 типа, при заболеваниях глаз. Точка зрения. Восток - Запад. 2015, № 1 стр. 195-196.
2. Слепова О.С., Светлова Е.В., Ковалева Л.А., Макаров П.В., Кугушева А.Э., Денисова Е.В., Вахова Е.С., Захарова Г.Ю., Кондратьева Ю.А., Андрюшин А.Е., Демкин В.В. Исследования вируса герпеса человека 6-го типа и других герпес-вирусов, вызывающих заболевания глаз, методом полимеразной цепной реакции. Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60. № 6. С. 45-48.
3. Светлова Е.В., Слепова О.С., Денисова Е.В., Ковалева Л.А., Еремеева Е.А., Макаров П.В., Кугушева А.Э., Вахова Е.С., Андрюшин А.Е., Демкин В.В. Лабораторная диагностика ВПГ6-инфекции при заболеваниях глаз. Медицинская иммунология. 2015. Т. 17. № 5. С. 325.
4. Светлова Е.В., Слепова О.С., Денисова Е.В., Ковалева Л.А., Еремеева Е.А., Макаров П.В., Кугушева А.Э., Вахова Е.С., Андрюшин А.Е., Демкин В.В. Результаты лабораторной диагностики ВГЧ6-инфекции при разных формах заболеваний глаз. Российский офтальмологический журнал. 2016. Т. 9. № 1. С. 73-77.
5. Комиссаров А.А., Карасева М.А., Сафина Д.Р., Рощина М.П., Беднова О.П., Казаков А.А., Демкин В.В., Демидюк И.В. Сравнительная оценка эффективности экспрессии трансгена в составе модельных генетических конструкций разной структуры. Молекул. генетика, микробиология и вирусология. 2016, № 3, с. 115-120.23-28.