

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

**XXVII ЕЖЕГОДНАЯ НАУЧНАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ**

5-6 февраля 2019 г., Москва

ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

5 февраля, вторник

Утреннее заседание, начало в 10:30

Открытие конференции

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

Председатель – С.В. Костров

Л.В. ОЛЕНИНА – ст.н.с. Лаборатории биохимической генетики животных ОМГК. «Исследования на дрозофиле: эффект положения генов; ядрышко и белок $\rho 1 \omega$; аспекты биологии герминальных клеток». (25 мин)

Ю.Я. ШЕВЕЛЕВ – зав. Лабораторией анализа регуляции генов ОМГК. «Ядерная ламина обеспечивает правильную пространственную организацию хромосом в интерфазном ядре». (20 мин)

Е.Г. ПАСЮКОВА – зав. Лабораторией геномной изменчивости ОМГК. «Исследование генетических 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. «Ядерная система контроля качества РНК участвует в ко-транскрипционной деградации транскриптов мобильных элементов в герминальных тканях *Drosophila*». (20 мин)

А.В. КУЛЬБАЧИНСКИЙ – зав. Лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов ОМГК. «Транскрипция поврежденных ДНК-матриц бактериальной РНК-полимеразой». (20 мин)

М.А. ПЕТРОВА – зав. Сектором анализа и хранения микроорганизмов ЛМГМ ОМГК. «Адаптивные *dif*-модули из плазмид «древних» штаммов *Acinetobacter lwoffii* и их распространение среди современных штаммов *Acinetobacter*». (15 мин)

П е р е р ы в

Вечернее заседание, начало в 16:00

Председатель – А.В. Кульбачинский

В.З. ТАРАНТУЛ – руководитель Отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики (ОВКМГ). «Изучение роли гена *TRIM14* человека в регуляции апоптоза в норме и при вирусной инфекции». (20 мин)

И.А. ГРИВЕННИКОВ – зав. Лабораторией молекулярной генетики соматических клеток ОВКМГ. «Регуляция процессов дифференцировки и функционирования соматических клеток млекопитающих, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека, с помощью геномного редактирования и химических факторов». (20 мин)

Л.В. ДЕРГУНОВА – зав. Лабораторией функциональной геномики ОМОГЧ. «Сравнительный транскриптомный анализ микроРНК и их мРНК-мишеней в мозге крыс под действием семакса в условиях экспериментальной ишемии». (15 мин)

А.В. ХРУНИН – ст.н.с. Лаборатории молекулярной генетики человека ОМОГЧ. «Сигналы естественного отбора в генофонде популяций северо-востока Европы и субарктического Уральского региона». (15 мин)

П.А. СЛОМИНСКИЙ – зав. Лабораторией молекулярных основ наследственных заболеваний. «Полноэкзомное секвенирование в изучении патогенеза мультифакториальных и моногенных заболеваний: нерешенные проблемы». (20 мин)

6 февраля, среда

Утреннее заседание, начало в 10:30

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. «Изменения в системе поли(АДФ-рибозил)ирования белков при старении и хронических патологиях: исследования на клеточных моделях». (15 мин)

А.А. АЛЕКСАНДРОВ – зав. Лабораторией биоинформатики. «Биоинформационный анализ и реконструкция процессов эволюции альфоидных ДНК приматов». (20 мин)

И.А. ХМЕЛЬ – зав. Лабораторией регуляции экспрессии генов микроорганизмов. «Биологическая активность и механизмы действия летучих органических соединений, синтезируемых микроорганизмами». (20 мин)

П е р е р ы в (15 мин)

Председатель – Е.Г. Пасюкова

Д.М. ЕСЮНИНА – ст.н.с. Лаборатории биологии РНК и эпигенетики. «Структура и функции бактериальных белков-аргонатов». (20 мин)

А.В. МАКАРОВА – зав. Лабораторией механизмов репликации поврежденной ДНК. «Характеристика ДНК-полимеразной активности ДНК-праймазы и ДНК-полимеразы человека PrimPol». (20 мин)

Е.И. Климук – ст.н.с. Лаборатории регуляции экспрессии генов мобильных элементов прокариот. «Изучение регуляции экспрессии генов системы рестрикции-модификации Kpn21». (20 мин)

В.В. ДЕМКИН – руководитель Центра клеточных и генных технологий (ЦКП). «Изучение динамики изменений компонентов микробиот человека». (20 мин)

Вечернее заседание, начало в 16:00**Председатель – И.А. Хмель**

С.В. КОСТРОВ – руководитель Отдела молекулярно-генетических основ биотехнологии и белковой инженерии (ОМГОБиБИ). «Разработка организменных моделей на основе *Danio rerio* для анализа механизмов развития опухолевых патологий и оценки эффективности функционирования генетических конструкций». (30 мин)

И.В. ДЕМИДЮК – зав. Лабораторией функциональной энзимологии ОМГОБиБИ. «Новое семейство белковых ингибиторов протеаз». (20 мин)

И.В. АЛЕКСЕЕНКО – зав. Сектором генной онкотерапии
ОМГОБиБИ. «Конструирование искусственных иммунных
клеточных взаимодействий в опухоли и исследование их
влияния на ее прогрессию». (15 мин)

Заключительное слово члена-корреспондента РАН
С.В. КОСТРОВА

Закрытие конференции

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

ИССЛЕДОВАНИЯ НА ДРОЗОФИЛЕ: ЭФФЕКТ ПОЛОЖЕНИЯ ГЕНОВ; ЯДРЫШКО И БЕЛОК Piwi; АСПЕКТЫ БИОЛОГИИ ГЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Л.В. Оленина

Лаборатория биохимической генетики животных
Отдела молекулярной генетики клетки (ОМГК)

Представлена генетическая система, позволяющая регистрировать в отдельных клетках на разных стадиях развития процесс эпигеномной транс-инактивации репортерного гена. Транс-инактивация демонстрирует случай эпигеномной гетерохроматизации генов, вызванной конъюгацией инвертированного участка хромосомы с нормальной гомологичной хромосомой и перемещением ее участка в гетерохроматиновый компартмент ядра. Эта оригинальная генетическая модель позволяет рассматривать механизмы гетерохроматизации хроматина и роль пространственной организации хромосом в ядре в связи с активностью гена. Неканонические функции ядрышка как органеллы, отвечающей на стресс, обсуждаются в связи с наблюдаемым *ex vivo* и *in vivo* перемещением Piwi из нуклеоплазмы в ядрышко при тепловом шоке. Показана роль РНК, синтезируемой в ядрышке РНК-полимеразой I (Pol I), в перераспределении Piwi из нуклеоплазмы в ядрышко в герминальных клетках яичников и в культуре соматических клеток. Обнаружено, что удержание Piwi в ядрышке радикально усиливается при тепловом шоке, но не при других типах стрессовых воздействий (например, при ацидозе). Для концентрирования Piwi в ядрышках клеток при тепловом шоке необходима транскрипция, осуществляемая Pol I, несмотря на то, что общий уровень ядрышковой транскрипции многократно снижается при тепловом шоке. Предполагается, что специфические стресс-индуцированные транскрипты, производимые Pol I, могут способствовать ядрышковому удержанию белков. В экспериментах на культуре соматических клеток яичников дрозофилы показано, что Piwi ограничивает индуцированную тепловым шоком транскрипцию сайт-специфичных ретротранспозонов R1 и R2, в обычно неактивных копиях рДНК, содержащих эти инсерции. Предполагается, что внутриядерный

шатлинг Piwi может играть роль в обеспечении баланса между репрессией рибосомных транспозонов при стрессе и канонической функцией Piwi в репрессии обычных мобильных элементов. Биология герминальных клеток дрозофилы рассматривается на примере обнаруженного нами нового белка герминальных клеток семенников, NACtes. Предполагается, что функции тканеспецифичного белка NACtes, гомолога вездесущего и связанного с рибосомами белка NAC, могут состоять в обеспечении эффективной трансляции специфических белков сперматоцитов и сперматид в процессе сперматогенеза. Присутствие NACtes показано в герминальной ткани личинок и семенниках взрослых особей, где его количество резко возрастает при дифференцировке сперматоцитов и сохраняется в процессе морфогенеза сперматид. В прицентромерном гетерохроматине X-хромосомы *D. melanogaster* найден кластер повторов *Vasa related (Varel)*, включающих последовательность, гомологичную четвертому и части пятого экзонов гена *vasa*, кодирующего эволюционно консервативную герминальную РНК-хеликазу *Vasa*. Повторы транскрибируются в обоих направлениях и являются источником образования широко представленного класса piРНК в герминальных клетках семенников. Однако транскрипты *vasa* избегают piРНК-зависимого сайленсинга благодаря их неполной комплементарности к *Varel* piРНК у *D. melanogaster*. В то же время *Varel* piРНК *D. melanogaster* подавляет экспрессию гена *vasa* близкородственного вида *D. mauritiana* в семенниках межвидовых гибридов *D. melanogaster*/*D. mauritiana*. В сперматоцитах межвидовых гибридов в отсутствие локуса *Suppressor of Stellate (Su(Ste))* на Y-хромосоме и соответствующих *Su(Ste)* piРНК происходит дерепрессия X-сцепленных генов *Stellate* с последующей мейотической катастрофой. Таким образом, piРНК-путь может участвовать в процессе репродуктивной изоляции между *Drosophila melanogaster* и близкородственными видами, вызывая гибридную стерильность с помощью нарушенной регуляции двух различных белок-кодирующих генов, *Vasa* и *Stellate*.

ЯДЕРНАЯ ЛАМИНА ОБЕСПЕЧИВАЕТ ПРАВИЛЬНУЮ ПРОСТРАНСТВЕННУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ХРОСОМ В ИНТЕРФАЗНОМ ЯДРЕ

Ю.Я. Шевелев

Лаборатория анализа регуляции генов ОМГК

Ядерная ламина представляет собой белковую сеть из ламин и ламин-ассоциированных белков, которая выстилает внутреннюю поверхность ядерной оболочки. Помимо других функций, ядерная ламина служит каркасом, к которому прикреплен неактивный, плотно упакованный хроматин, находящийся в ламина-ассоциированных доменах (ЛАДах). До сих пор, однако, вклад ядерной ламины в компактизацию ЛАДов и в поддержание глобальной архитектуры хромосом оставался неясен.

Совместно с С.В. Ульяновым, С.В. Разиным (ИБГ РАН) и Е.Е. Храмеевой (Сколтех), а также с рядом других коллег мы провели исследование того, что происходит с пространственной организацией хроматина при утрате его связи с ядерной ламиной. В качестве модельной системы была выбрана культивируемая линия клеток дрозофилы S2, в которой была искусственно подавлена экспрессия ламина Dm0 и отсутствовала экспрессия ламина C, т.е. в результате была практически полностью разрушена ядерная ламина. Мы обнаружили, что при утрате обоих ламин в клетках S2 происходит удаление хроматина от ядерной оболочки, приводящее к незначительному увеличению его общей плотности в ядре. Интересно, что в отличие от клеток млекопитающих, в клетках S2 не наблюдалось заметного смещения хроматина с ядерной оболочки внутрь ядра после деплеции ламин-B-рецептора (при одновременном отсутствии ламина C).

Методом chromosome conformation capture with high throughput sequencing (Hi-C) были проанализированы изменения плотности хроматина в топологически-ассоциированных доменах (ТАДах) в клетках S2, утративших оба ламина. Оказалось, что плотность хроматина в ТАДах, состоящих преимущественно из неактивного хроматина, уменьшается, в то время как в ТАДах с высокой долей активного хроматина, а также в меж-ТАДах плотность хроматина, наоборот, увеличивается. Декомпактизация хроматина в неактивных ТАДах после их открепления от ядерной ламины была подтверждена

методом двуцветной флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием зондов к противоположным концам одного из ТАДов. ChIP-seq анализ с антителами к H3-пан-ацетилированным гистонам и RNA-seq анализ транскрипции в клетках S2, утративших оба ламина, показали повышение уровня ацетилирования гистонов и усиление фоновой транскрипции генов в ЛАДах.

Полученные результаты свидетельствуют о двоякой функции ядерной ламины в поддержании хромосомной архитектуры. Связывание ТАДов с ядерной ламиной делает их более компактными, подавляя фоновую транскрипцию. В то же время, связывание хроматина с ядерной ламиной приводит к уменьшению его общей плотности в ядре из-за некоторого растягивания интерфазных хромосом на ядерной оболочке.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ КОНТРОЛЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ У ДРОЗОФИЛЫ

Е.Г. Пасюкова

Лаборатория геномной изменчивости ОМГК

В течение ряда лет в лаборатории проводилось исследование роли нейронального гена *escargot* (*esg*), кодирующего транскрипционный фактор РНК-полимеразы II, в контроле продолжительности жизни. В докладе будут подведены итоги этой работы по материалам опубликованной в 2018 году статьи (Symonenko A. V., Roshina N. V., Kremntsova A. V., Pasyukova E. G. Reduced neuronal transcription of *escargot*, the *Drosophila* gene encoding a Snail-type transcription factor, promotes longevity. *Front. Genet.*, 2018, 9:151) и обсуждены дальнейшие направления исследования.

Встройка векторной конструкции в 3'-регуляторную область гена *esg* на расстоянии 602 пары нуклеотидов вниз от конца единственного экзона приводит к увеличению продолжительности жизни самцов и самок дрозофилы. Анализ кривых выживания и подвижности мух в разном возрасте показал, что встройка влияет на скорость старения. Влияние встройки на продолжительность жизни не зависит от величины встроенного фрагмента ДНК. Увеличенная продолжительность жизни связана с уменьшением уровня транскрипции *esg*. В частности, нокдаун гена в нервной системе увеличивает продолжительность жизни, что прямо свидетельствует о роли нейрональной функции *esg* в контроле продолжительности

жизни. Транскрипционные каскады являются одним из ключевых механизмов регуляции развития и метаболизма. Известно, что увеличение транскрипции *esg* приводит к изменению транскрипции около 100 генов-мишеней, среди которых известные гены, вовлеченные в контроль продолжительности жизни, гены, кодирующие ферменты, участвующие в синтезе нейротрансмиттеров и нейропептидов (Hekmat-Scafe et al., 2005, Genetics, 169, 1477-1493). Остается неясным, совпадают ли мишени гена при увеличении и уменьшении его транскрипции.

Полученные результаты привлекли наше внимание к регуляции транскрипции гена *esg*, которая зависит от встройки фрагментов ДНК разного размера в 3'-регуляторную область гена, и стимулировали продолжение работы, направленное на более тщательное исследование структурно-функциональных особенностей этой регуляторной области. Анализ *in silico* позволяет выявить в этой области потенциальные сайты связывания различных регуляторных белков и регуляторные платформы. Мы планируем исследовать структурные особенности и природный полиморфизм 3'-регуляторной области гена *esg*, используя дрозофил из природных популяций, имеющих в нашем распоряжении. В дальнейшем функциональная роль выявленного полиморфизма будут исследована экспериментально в соответствии с методическим подходом, отработанным в лаборатории (Rybina et al., 2018, Biochim. Biophys. Acta, Gene Regul. Mech., 5:451-462).

**Публикации Отдела молекулярной генетики клетки
(ЛБГЖ, ЛАРГ, ЛГИ):**

1. Pindyurin AV, Ilyin AA, Ivankin AV, Tselebrovsky MV, Nenasheva VV, Mikhaleva EA, Pagie L, van Steensel B, Shevelyov YY. The large fraction of heterochromatin in Drosophila neurons is bound by both B-type lamin and HP1a. Epigenetics & Chromatin, 2018, 11:65.
2. Шевелев Ю.Я., Ульянов С.В. Роль ядерной ламины в репрессии генов и поддержании хромосомной архитектуры в ядре. Биохимия, 2018, 83:503-514.
3. Шацких А.С., Оленкина О.М., Солодовников А.А., Лавров С.А. Система регулируемой экспрессии генов как инструмент исследования гетерохроматинового эффекта положения у Drosophila. Биохимия, 2018, 83:712-723.

4. Radion E, Morgunova V, Ryazansky S, Akulenko N, Lavrov S, Abramov Y, Komarov PA, Glukhov SI, Olovnikov I, Kalmykova A. Key role of piRNAs in telomeric chromatin maintenance and telomere nuclear positioning in *Drosophila* germline. *Epigenetics & Chromatin*, 2018, 11:40.
5. Kordyukova M, Morgunova V, Olovnikov I, Komarov PA, Mironova A, Olenkina OM, Kalmykova A. Subcellular localization and Egl-mediated transport of telomeric retrotransposon HeT-A ribonucleoprotein particles in the *Drosophila* germline and early embryogenesis. *PLoS One*, 2018, 13:e0201787.
6. Akulenko N, Ryazansky S, Morgunova V, Komarov PA, Olovnikov I, Vaury C, Jensen S, Kalmykova A. Transcriptional and chromatin changes accompanying de novo formation of transgenic piRNA clusters. *RNA*, 2018, 24:574-584.
7. Ryazansky S, Kulbachinskiy A, Aravin AA. The expanded universe of prokaryotic Argonaute proteins. *Mbio*, 2018, 9:e01935-18.
8. Rybina OY, Rozovsky YM, Veselkina ER, Pasyukova EG. Polycomb/Trithorax group-dependent regulation of the neuronal gene *Lim3* involved in *Drosophila* lifespan control. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, 2018, 1861:451-462.
9. Symonenko AV, Roshina NV, Kremntsova AV, Pasyukova EG. Reduced neuronal transcription of *Escargot*, the *Drosophila* gene encoding a Snail-type transcription factor, promotes longevity. *Front. Genet.*, 2018, 9:151.
10. Roshina NV, Symonenko AV, Kremntsova AV, Tsybul'ko EA, Alatortsev VE, Pasyukova EG, Mukha DV. *Drosophila melanogaster* inhabiting northern regions of European Russia are infected with *Wolbachia* which adversely affects their life span. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2018, 22:568-573.
11. Мартынова Е.У., Зотова М.И., Тростников М.В., Муха Д.В. Гетерологичная экспрессия капсидного белка VP3 денсовируса рыжего таракана в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: анализ внутриклеточной локализации. *Генетика*, 2018, 54(Приложение): S5-S9.
12. Глазер В.М., Ким А.И., Кузьмин И.В., Нефедова Л.Н., Орлова Н.Н., Пасюкова Е.Г., Романова Н.И. Сборник задач и вопросов по общей и молекулярной генетике. Учебное пособие. 2018. Москва, КДУ Университетская книга. 236 с. ISBN: 978-5-91304-817-2.
13. Зыкова Т. Ю. , Попова О. О. , Хорошко В. А. , Левицкий В. Г. , Лавров С. А. , Жимулев И. Ф. Генетическая организация доменов открытого

типа, расположенных в междисках политенных хромосом дрозофилы
// Доклады Академии наук. 2018. Т. 483. № 1, стр. 98-102.

ЯДЕРНАЯ СИСТЕМА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РНК УЧАСТВУЕТ В КО-ТРАНСКРИПЦИОННОЙ ДЕГРАДАЦИИ ТРАНСКРИПТОВ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕРМИНАЛЬНЫХ ТКАНЯХ DROSOPHILA

А.И. Калмыкова

Лаборатория исследования геномных повторов эукариот

Ccr4-Not является высоко-консервативным мультикомпонентным деаденилазным комплексом, участвующим в механизме контроля качества РНК от момента транскрипции до ее деградации в цитоплазме. На дрожжевой модели показана роль комплекса Ccr4-Not в деградации aberrантных транскриптов путем привлечения ядерной экзосомы. У *Drosophila* Ccr4-Not связан с трансляционной репрессией мишеней микроРНК и пост-транскрипционным контролем материнских мРНК в процессе оогенеза и эмбрионального развития. Мы выявили новую роль комплекса Ccr4-Not в метаболизме ядерной РНК в зародышевой линии дрозофилы. У мух с нарушениями работы деаденилазы Ccr4 — основного компонента комплекса Ccr4-Not — наблюдается накопление транскриптов различных мобильных элементов и теломерных повторов во фракции хроматин-ассоциированной РНК из яичников дрозофилы. При этом не происходит нарушения транскрипционного сайленсинга, что указывает на ко-транскрипционный механизм регуляции. Ядерные мишени Ccr4-Not в основном являются активными полноразмерными мобильными элементами, включая основной теломерный ретротранспозон HeT-A. Экспрессия кодирующих генов не регулируется на этом уровне с помощью Ccr4-Not. Отсутствие очевидных генных мишеней позволяет предположить, что система с участием Piwi-interacting РНК (piРНК) может привлекать ядерный комплекс Ccr4-Not для деградации транскриптов мобильных элементов в зародышевой линии. Действительно, с помощью ко-иммунопреципитации мы обнаружили взаимодействия между компонентами комплекса Ccr4-Not и ядерным белком piРНК пути - Piwi, что указывает на то, что эти системы взаимодействуют в ко-транскрипционном распознавании и активации процесса деградации

транскриптов мобильных элементов. Физически комплекс Csr4-Not не связан с хроматином, но с помощью иммуноокрашивания выявляется в виде гранул рядом с теломерами и другими участками хромосом в ядрах герминальных клеток, однако эти гранулы исчезают при нарушении piRNA пути. Содержание коротких РНК не меняется на фоне мутации Csr4, что говорит о том, что деаденилазный комплекс не участвует в процессинге piRNA. Эти результаты позволяют предположить, что привлечение Csr4-Not осуществляется комплексом белка Piwi с piRNA, при комплементарном взаимодействии короткой РНК с вновь-образованными транскриптами. Наши данные выявили новый уровень piRNA-зависимой регуляции экспрессии транспозонов в зародышевой линии, который можно отнести к механизму CTGS (co-transcriptional gene silencing). Вместе с транскрипционным и посттранскрипционным сайленсингом (TGS и PTGS, соответственно) этот механизм обеспечивает контроль экспрессии мобильных элементов в герминальных клетках, что важно для поддержания целостности генома.

Публикации Лаборатории исследования геномных повторов эукариот:

1. N. Akulenko, S. Ryazansky, V. Morgunova, P.A. Komarov, I. Olovnikov, C. Vaury, S. Jensen and A. Kalmykova Transcriptional and chromatin changes accompanying de novo formation of transgenic piRNA clusters. RNA, 24: 574-584, 2018.
2. M. Kordyukova, I. Olovnikov, A. Kalmykova. Transposon control mechanisms in telomere biology. Current Opinion in Genetics & Development, 49:56-62, 2018.
3. Elizaveta Radion, Valeriya Morgunova, Sergei Ryazansky, Natalia Akulenko, Sergey Lavrov, Yuri Abramov, Pavel Komarov, Sergey Glukhov, Ivan Olovnikov, Alla Kalmykova. Key role of piRNAs in telomeric chromatin maintenance and telomere nuclear positioning in Drosophila germline. Epigenetics&Chromatin,11(1):40, 2018.
4. Maria Kordyukova, Valeriya Morgunova, Ivan Olovnikov, Pavel A. Komarov, Anastasia Mironova, Oxana M. Olenkina, Alla Kalmykova. Subcellular localization and Egl-mediated transport of telomeric retrotransposon HeT-A ribonucleoprotein particles in the Drosophila germline and early embryogenesis. PLOS One, 13, e0201787, 2018.

ТРАНСКРИПЦИЯ ПОВРЕЖДЕННЫХ ДНК-МАТРИЦ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗой

А.В. Кульбачинский

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов ОМГК

Молекулы ДНК в клетке постоянно подвергаются действию различных повреждающих факторов, что может приводить к нарушениям репликации и мутагенезу. Известно, что повреждения ДНК способны значительно влиять на процесс транскрипции, причем РНК-полимераза (РНКП) является сенсором на наличие повреждений, способствуя репарации матричной цепи ДНК. Изучение влияния нарушений в структуре ДНК на работу РНКП необходимо для понимания механизмов действия повреждающих факторов на экспрессию генов, а также на процессы репарации и стабильность генома. В то же время, молекулярные механизмы транскрипции поврежденных ДНК-матриц РНК-полимеразой во многом остаются неизвестными.

В нашей работе исследована активность РНКП *Escherichia coli* и *Deinococcus radiodurans* на матрицах ДНК, содержащих в своем составе различные поврежденные нуклеотиды. Показано, что, хотя данные бактерии сильно различаются по устойчивости к ДНК-повреждающим воздействиям, их РНКП реагируют на наличие в ДНК повреждений сходным образом. Присутствие в ДНК повреждений, сильно нарушающих спаривание нуклеотидов (тиминовые димеры, 1,N6-этенoadенин, AP-сайты), значительно ингибирует транскрипцию. При этом во всех трех случаях напротив матричного нуклеотида предпочтительно встраивается адениновый нуклеотид. При наличии в матрице 8-оксогуанина РНКП способна включить напротив него остаток аденина и осуществлять дальнейшее удлинение такого ошибочного РНК-транскрипта. Наличие в матрице тимин-гликоля слабо влияет на транскрипцию.

Исследовано влияние мутаций в области активного центра РНКП на транскрипцию поврежденной ДНК. Показано, что замены в участках РНКП, контактирующих с матричным нуклеотидом, в целом снижают эффективность транскрипции поврежденных матриц. В то же время, определенные аминокислотные замены в «триггерной петле» в активном центре РНКП улучшают транскрипцию поврежденной ДНК, вероятно, способствуя включению нуклеотидов в синтезируемую РНК.

Показано, что транскрипционные комплексы, остановленные в поврежденных участках ДНК-матрицы, являются мишенью для действия Mfd-транслоказы, которая вызывает их диссоциацию в системе *in vitro*. Gfh-факторы *D. radiodurans* усиливают остановку транскрипции при наличии в ДНК поврежденных нуклеотидов и способствуют действию белка Mfd. Таким образом, различные типы повреждений в ДНК-матрице по-разному влияют на эффективность и точность транскрипции и способны либо приводить к синтезу ошибочных РНК-транскриптов, либо к остановке РНКП, причем этот процесс может модулироваться факторами транскрипции и репарации ДНК.

**АДАПТИВНЫЕ *DIF*-МОДУЛИ ИЗ ПЛАЗМИД «ДРЕВНИХ»
ШТАММОВ *ACINETOBACTER LWOFFII* И ИХ
РАСПРОСТРАНЕНИЕ СРЕДИ СОВРЕМЕННЫХ ШТАММОВ
*ACINETOBACTER***

М.А. Петрова

Сектор анализа и хранения микроорганизмов ЛМГМ ОМГК

Продолжено изучение мобильных элементов природных бактерий, участвующих в горизонтальном переносе генов (ГПГ) устойчивости к антибиотикам и солям тяжелых металлов. За последнее время в составе плазмид клинических штаммов *Acinetobacter* были обнаружены необычные мобильные элементы, названные *dif*-модулями, которые участвуют в распространении генов устойчивости к различным антибиотикам: β -лактамам, тетрациклину и макролидам. Такие мобильные элементы ограничены последовательностями очень сходными по структуре с хромосомными *dif*-сайтами – компонентами системы рекомбинации *dif/Xer*, которая имеется у большинства видов протеобактерий в силу важной роли, которую она играет в разрешении хромосомных и плазмидных димеров, генерируемых при репликации ДНК. В связи с такой структурой *dif*-модулей и широким распространением одних и тех же *dif*-модулей в составе различных плазмид было сделано предположение о том, что они являются мобильными элементами, в перемещении которых принимает участие система рекомбинации *dif/Xer*. Однако было не ясно, существует ли такой механизм ГПГ у

природных штаммов *Acinetobacter* и других родов бактерий. Поэтому в 2017-18 гг. основное внимание было уделено поиску дополнительных (additional) *dif*-подобных сайтов (*add-dif*) и образованных ими *dif*-модулей в геномах плазмид мерзлотных штаммов *A. lwoffii* и анализу их роли в распространении адаптивных генов в природных и кинических штаммах *Acinetobacter*.

Установлено, что широкое распространение *add-dif* в плаزمидах и хромосомах бактерий рода *Acinetobacter* является характерной особенностью этого рода. Изучены закономерности распространения *add-dif* на плазмидах разного размера *Acinetobacter*. Показано, что для плазмид двух типов: крупных (200-400 тпн) и средних (22-40 тпн) характерно наличие нескольких копий (не менее 5-8) *add-dif* в одной и той же плазмиде, что указывает на их важную роль в структурных перестройках плазмидной ДНК у штаммов *Acinetobacter*. Установлено, что хромосомы большинства штаммов *Acinetobacter* также содержат *add-dif*, и их сходство с плазмидными *add-dif* выше, чем с основным хромосомным сайтом *dif1*. Кроме того на плазмидах «древних» штаммов *A. lwoffii* были обнаружены семь новых *dif*-модулей, содержащих гены с различными адаптивными функциями. Все они также распространены в современных плазмидах различных видов *Acinetobacter*, включая *A. baumannii*.

Таким образом, широкое распространение *dif*-модулей является характерной особенностью видов *Acinetobacter* и может способствовать их высокой адаптивности как в природе, так и в клинике.

**Публикации Лаборатории молекулярной генетики
микроорганизмов, Сектора анализа и хранения
микроорганизмов ЛМГМ ОМГК:**

1. Pupov D, Petushkov I, Esyunina D, Murakami KS, Kulbachinskiy A. 2018. Region 3.2 of the σ factor controls the stability of rRNA promoter complexes and potentiates their repression by DksA. *Nucleic Acids Res.* 46(21): 11477-11487.
2. Dulin D., Bauer D.L.V., Malinen A.M., Bakermans J.J.W., Kaller M., Morichaud Z., Petushkov I., Depken M., Brodolin K., Kulbachinskiy A., Kapanidis A.N. 2018. Pausing controls branching between productive and non-productive pathways during initial transcription in bacteria. *Nat Commun.* 9(1): 1478.

3. Miropolskaya N., Feklistov A., Nikiforov V., Kulbachinskiy A. 2018. Site-specific aptamer inhibitors of *Thermus* RNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495(1): 110-115.
4. Lisitskaya L, Aravin AA, Kulbachinskiy A. 2018. DNA interference and beyond: structure and functions of prokaryotic Argonaute proteins. *Nat Commun.* 9(1): 5165.
5. Ryazansky S., Kulbachinskiy A., Aravin A.A. 2018. The Expanded Universe of Prokaryotic Argonaute Proteins. *MBio* 9(6). pii: e01935-18.
6. Liu Y, Esyunina D, Olovnikov I, Teplova M, Kulbachinskiy A, Aravin AA, Patel DJ. 2018. Accommodation of Helical Imperfections in *Rhodobacter sphaeroides* Argonaute Ternary Complexes with Guide RNA and Target DNA. *Cell Rep.* 24(2): 453-462.
7. Boldinova EO, Ignatov A, Kulbachinskiy A, Makarova AV. 2018. The active site residues Gln55 and Arg73 play a key role in DNA damage bypass by *S. cerevisiae* Pol η . *Sci Rep.* 8(1): 10314.
8. Олина А.В., Кульбачинский А.В., Аравин А.А., Есюнина Д.М. 2018. Белки-аргонавы и механизмы РНК-интерференции у эукариот и прокариот. *Биохимия* 83: 645-661.
9. Mindlin S, Petrenko A, Petrova M. Chromium resistance genetic element flanked by XerC/XerD recombination sites and its distribution in environmental and clinical *Acinetobacter* strains. *FEMS Microbiol Lett.*, 2018, 365(8): fny047.
10. Ефименко Т. А., Ефременкова О.В., Демкина Е.В., Петрова М.А., Сумарукова И.Г., Васильева Б.Ф., Эль-Регистан Г.И. 2018. Бактерии, выделенные из вечной мерзлоты Антарктики – эффективные продуценты антибиотиков. *Микробиология* 87(5):573-580.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ГЕНА TRIM14 ЧЕЛОВЕКА В РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА В НОРМЕ И ПРИ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

В.З. Тарантул

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

Ген *TRIM14* является членом большого мультигенного семейства, многие члены которого (свыше 70) участвуют в работе врожденной иммунной системы и оказывают противовирусное действие. Кроме того, как и свыше половины других генов этого семейства, *TRIM14* играет заметную роль в онкогенезе и апоптозе. При этом

данные о роли этого гена в апоптозе противоречивы. Показано, что в отдельных типах раковых клеток повышенная экспрессия *TRIM14* ингибирует апоптоз, а в других усиливает этот процесс. Для выяснения роли *TRIM14* в апоптозе в нормальных клетках и при вирусной инфекции мы использовали несколько моделей (культуру клеток аденокарциномы человека A549 и трансгенных вьюнов *Misgurnus fossilis* L.).

У трансгенных вьюнов с геном *TRIM14* человека дикого типа и мутантным геном (620C>T) (обнаружен у пациентов с глиобластомой) возросло число пикнотических ядер по сравнению с контролем. С помощью метода TUNEL показано, что у трансгенных личинок вьюна, содержащих обе формы гена *TRIM14*, происходит усиление процесса апоптоза. Транскрипция проапоптотических генов (*bax*, *tp53* и *casp9*) значительно усиливалась у трансгенных личинок с геном дикого типа и не изменялась у рыб с мутантным геном. Это может свидетельствовать о том, что мутация, обнаруженная в раковых клетках, может снижать апоптотический потенциал гена *TRIM14*.

Анализ клеток линии A549, трансфицированных геном *TRIM14*, показал, что в них также происходит усиление транскрипции проапоптотических генов. При инфицировании этих клеток вирусом гриппа (штамм H5N2/MallardDuck/Pennsylvania) титр вируса резко снижался, т.е. *TRIM14* проявляет сильно выраженный антивирусный эффект.

С целью изучения роли гена *TRIM14* в апоптозе при инфицировании клеток A549 вирусом гриппа было проведено определение маркеров процессов апоптоза/некроза (с помощью проточной цитофлуориметрии в клетках нормальной линии A549, линии A549 с гиперэкспрессией гена *TRIM14* (A549TRIM14) и клетках с нокадаунм эндогенного гена *TRIM14*, осуществленным с помощью метода Crispr/Cas (A549 KOTRIM14). Показано, что при вирусной инфекции как повышенная, так и пониженная экспрессия гена *TRIM14* в клетках не вызывают изменений в апоптозе. Следовательно, антивирусный эффект этого гена не связан с его проапоптотическим действием.

Таким образом, в норме повышенная экспрессия *TRIM14* приводит к усилению апоптоза как *in vivo* (в трансгенных личинках вьюна), так и *in vitro* (в трансфицированных клетках A549). Антивирусное действие гена *TRIM14*, скорее всего, не связано с изменениями в апоптотических процессах.

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ВКЛЮЧАЯ ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА, С ПОМОЩЬЮ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

И.А. Гривенников

Лаборатория молекулярной генетики соматических клеток
ОВКМГ

Продолжены работы по созданию клеточных моделей болезни Паркинсона (БП) на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от пациентов, страдающих различными формами этого заболевания. Получены новые линии ИПСК от двух пациентов с БП, содержащих мутации в гене *PARK2*, и проведена их молекулярно-биологическая характеристика. Осуществлена дифференцировка этих клеток в нейрональном направлении. Отработан метод, основанный на использовании ВЭЖХ, определения уровня дофамина и его производных в дифференцированных нейрональных культурах ИПСК. Показано, что *NMDA* и *GABA-A* рецепторы вовлечены в регуляцию роста нейритов и развития спонтанной активности при дифференцировке ИПСК. Полученные результаты указывают на возможность использования лигандов *NMDA* и *GABA-A* рецепторов для регуляции фенотипа нейронов человека при их дифференцировке *in vitro*.

Проведены работы по оценке транскриптома нейронов, полученных из ИПСК, дифференцированных по протоколу получения дофаминергических нейронов, от 5 здоровых доноров и двух пациентов с БП с мутацией в гене паркина (*PARK2*). Первичный анализ дифференциальной экспрессии генов выявил около 120 генов, экспрессия которых в 2 и более раз ниже в дифференцированных ИПСК с мутацией в гене паркин, и более 260 генов экспрессия которых повышена в этих клетках, по сравнению с клетками здоровых доноров.

На модели дифференцированных нейронов, полученных из ИПСК от нормальных доноров и пациентов с БП, проведено исследование влияния каннабиноидов АДА (*N*-арахиноилдофамин) и ДДА (докозагексаеноилдофамин) на их жизнеспособность в условиях окислительного стресса, вызванного добавлением перекиси

водорода. Было показано, эти соединения обладают существенным защитным эффектом. Продолжаются работы по созданию на основе ИПСК человека других токсических моделей с использованием ротенона и МРТР, которые могут быть полезны для тестирования соединений на нейропротекторную активность.

В Лаборатории разрабатываются протоколы получения глиальных клеток из ИПСК здоровых доноров и пациентов с БП. К настоящему времени получены первые культуры астроцитоподобных клеток. Полученные глиальные клетки детектируются с помощью антител к антигенам глиальных клеток S-100 и GFAP и экспрессируют ряд характерных для них мРНК. Осуществлены первые эксперименты по кокультивированию астроцитов и дифференцированных нейронов.

Продолжены работы по исследованию молекулярно-генетических основ депрессивных состояний на разных животных моделях. В рамках экспериментальной модели развития неврологических нарушений во взрослом возрасте вследствие стрессогенных воздействий в ранний постнатальный период обнаружено, что хроническое интраназальное введение Семакса крысам, перенесшим неонатальную изоляцию в первые две недели жизни, приводило к снижению уровней тревожности и депрессивности, и улучшению способности к обучению в течение второго месяца жизни. Введение Семакса также предотвращало, вызванное неонатальной изоляцией, снижение уровней BDNF в гиппокампе двухмесячных животных и повышение уровней BDNF во фронтальной коре одномесячных животных (совместно с кафедрой физиологии человека и животных МГУ). Совместно с Лабораторией молекулярной генетики наследственных болезней проведено транскриптомное профилирование гиппокампа крысы в модели депрессивноподобного поведения, вызванного системным воспалением под действием липополисахарида.

Публикации Отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики:

1. Tarantul V.Z. Many faces of TRIM family proteins in the field oncoimmunology. Universal Journal of Oncology, 2018, 1, 1-37. <http://uapublications.com/oncology/article.php>.
2. Sukhanova IA, Sebentsova EA, Khukhareva DD, Manchenko DM, Glazova NY, Vishnyakova PA, Inozemtseva LS, Dolotov OV, Vysokikh MY, Levitskaya

- NG. Gender-dependent changes in physical development, BDNF content and GSH redox system in a model of acute neonatal hypoxia in rats. *Behav. Brain Res.*, 2018, 350, 87-98. doi: 0.1016/j.bbr.2018.05.008.
3. Gening L.V., Shevchenko O.V., Kazachenko K.Y., Tarantul V.Z. "Mirror" method to estimate mutagenic activity of DNA lesions. *Methods and Protocols*, 2018, 1, 32-38; doi: 10.3390/mps1030032.
4. Nenasheva V.V., Stepanenko E.A. Makarova I.V., Khaidarova N.V., Antonov S.A., Kozikova L.V., Polteva E.A., Kovaleva G.V., Ayed Z., Vovk A.D., Shcherbatova N.A., Andreeva L.E., Tarantul V.Z. Expression of the human TRIM14 and its mutant form (P207L) promotes apoptosis in transgenic larvae of loach *Misgurnus fossilis* L. *Mol. Biol. Rep.*, 2018, 45, 2087-2093. doi: org/10.1007/s11033-018-4365-7.
5. Ветчинова А.С., Симонова В.В., Новосадова Е.В., Мануилова Е.С., Ненашева В.В., Тарантул В.З., Гривенников И.А., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н. Цитогенетический анализ результатов геномного редактирования на клеточной модели болезни Паркинсона. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2018, 165, №3, 355-359, doi: 10.1007/s10517-018-4174-y.
6. Симонова В.В., Ветчинова А.С., Новосадова Е.В., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н. Геномное редактирование и проблема тетраплоидии при клеточном моделировании генетической формы паркинсонизма. *Биохимия*, 2018, 83, № 9, 1311-1317. DOI: 10.1134/S0006297918090055.
7. Суханова Ю.А., Володина М.А., Себенцова Е.А., Глазова Н.Ю., Манченко Д.М., Иноземцева Л.С., Андреева Л.А., Долотов О.В., Левицкая Н.Г. Долговременные изменения поведения и содержания BDNF в мозге крыс, вызванные неонатальной изоляцией: эффекты аналога АКТГ(4-10) семакса. *Нейрохимия*, 2018, 35, № 1, 50-61. DOI:10.1134/S1819712418010154.
8. Кутукова К.А., Фрумкина Л.Е., Иванов М.В., Новосадова Е.В., Симонова В.В., Антонов С.А., Гривенников И.А., Худюерков Р.М., Хаспеков Л.Г. Ультраструктура клеток, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в вентральные мезенцефалические нейроны. *Асимметрия*, 2018, 12, 4, 308-314.
9. Муджири Н.М., Захидов С.Т., Рудой В.М., Дементьева О.В., Макаров А.А., Макарова И.В., Зеленина И.А., Андреева Л.Е., Маршак Т.Л. Цитогенетическая активность наночастиц золота в половых и соматических клетках мышей линии 129 с нонсенс-мутацией в гене

ДНК-полимеразы йота. Известия Российской академии наук. Серия биологическая, 2018, № 2, 137-143. DOI: 10.7868/S0002332918020017.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОРНК И ИХ мРНК-МИШЕНЕЙ В МОЗГЕ КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ СЕМАКСА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

**Л.В. Дергунова, И.Б. Филиппенков, В.В. Ставчанский,
О.Ю. Сударкина, С.А. Лимборская**
Лаборатория функциональной геномики
Отдела молекулярных основ генетики человека (ОМОГЧ)

Ишемический инсульт занимает одно из первых мест в структуре общей смертности населения России. Изучение молекулярных механизмов повреждения, а также разработка новых стратегий, направленных на лечение или предотвращение этого заболевания, относятся к числу важнейших задач современной медицины. Применение транскриптомного анализа с использованием транзиторной окклюзии средней мозговой артерии (tMCAO) у крыс позволило нам существенно детализировать механизмы действия нейропептидного препарата семакс, уже многие годы используемого при лечении ишемического инсульта и его последствий. Сравнительный анализ содержания кодирующих РНК в отделах мозга крыс, получающих семакс, в условиях модели tMCAO выявил сотни дифференциально функционирующих генов и десятки сигнальных путей, активируемых пептидом. Было показано, что в течение первых суток после tMCAO семакс проявляет эффект, компенсирующий патологические воздействия ишемии-реперфузии.

В настоящее время убедительно показано, что в ответе на патологическое воздействие ишемии участвуют не только кодирующие мРНК, но и различные типы регуляторных РНК, к числу которых относятся микроРНК. Для изучения механизмов нейропротективного эффекта семакса с помощью метода RNA-Seq проведен сравнительный анализ уровня микроРНК в отделах мозга крыс, подвергнутых tMCAO, получавших семакс или физиологический раствор. Под воздействием семакса в мозге крыс с ишемией более чем в 1,5 раза изменилась экспрессия 139 микроРНК. С использованием биоинформатического анализа баз данных mirdb,

mirtarbase и diana для большинства из них обнаружены мРНК-мишени. Проведена функциональная аннотация генов, мРНК которых имеют сайты связывания с микроРНК, изменившими экспрессию под действием семакса, а также выявлены биологические процессы, в которых они участвуют. Обнаруженные мРНК-мишени ассоциированы с 78 сигнальными путями, среди которых выявляются сигнальные пути, связанные с воспалением, иммунным ответом, с клеточной пролиферацией и гибелью, с функционированием трофических факторов, с нейросигнализацией.

Анализ содержания транскриптов, имеющих сайты связывания с микроРНК, показал, что в условиях tMCAO под действием семакса более чем в 1,5 раза изменился уровень 80 мРНК-мишеней. Из них 45 мРНК увеличили, а 35 – снизили свой уровень. Ассоциативный анализ показал, что мРНК-мишени, увеличившие свой уровень в группе животных с ишемией, получавших семакс, главным образом связаны с каталитической и рецепторной активностью, с функционированием ионных каналов, при этом мРНК-мишени, снизившие свой уровень, связаны преимущественно с активностью факторов роста, транскрипционных факторов, а также с функциями организации цитоскелета.

Таким образом, полученные результаты могут указывать на участие микроРНК в регулировании экспрессии генов – возможных потенциальных мишеней воздействия пептидного препарата семакс в условиях ишемии-реперфузии.

СИГНАЛЫ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА В ГЕНОФОНДЕ ПОПУЛЯЦИЙ СЕВЕРО-ВОСТОКА ЕВРОПЫ И СУБАРКТИЧЕСКОГО УРАЛЬСКОГО РЕГИОНА

**А.В. Хрунин¹, Г.В. Хворых¹, А.Н.Федоров^{1,2},
С.А. Лимборская¹**

¹ Лаборатория молекулярной генетики человека

Отдела молекулярных основ генетики человека (ОМОГЧ),

² Department of Medicine, Health Science Campus, The University
of Toledo, Toledo, USA

Становление генофонда любой популяции и любого этноса определяется совокупностью различных факторов, одни из которых связаны с демографической и эволюционной историей популяции, а

другие – с действием естественного отбора, осуществляющего адаптацию генофонда популяции к конкретным условиям среды обитания. Так как участки генома, подвергшиеся действию естественного отбора, как правило, являются функционально значимыми, то их идентификация, очевидно, может иметь принципиальное значение не только для формального понимания причин существования той или иной структуры популяций, но и для оценки влияния связанных с ними фенотипов на жизнь и здоровье человека.

В рамках нашей работы был осуществлен поиск следов отбора в полногеномных данных генотипов популяций европейской части России и Уральского региона (русские из Вологодской и Архангельской областей, вепсы, ижемские и прилузские коми, ханты, манси, ненцы), полученных с использованием ДНК-микрочипов OmniExpress, емкостью 715-730 тыс. SNPs. Поиск основывался на оценке уровней гомозиготности гаплотипов вокруг каждого из аллельных вариантов анализируемых полиморфных маркеров. Аллели, которые входили в состав более длинных гаплотипов, рассматривались в качестве маркеров действия естественного отбора. Анализ проводился как в индивидуальных популяциях (тест iHS, integrated haplotype score), так и в парах популяций, одна из которых являлась контрольной по отношению к остальным (тест XP-EHH, cross-population extended haplotype homozygosity). С использованием обоих тестов в каждой из популяций были выявлены по несколько сотен сигналов отбора. Путем аннотирования они были соотнесены с определенными участками генома и расположенными в них генами.

Среди наиболее экстремальных были сигналы, ассоциированные с районами локализации генов RTPRM, NRG3, NBEA и MESTP3. При этом сигналы, ассоциированные с RTPRM и NRG3, детектировались преимущественно в европейских популяциях, тогда как в случае NBEA и MESTP3 – исключительно в северо-уральских. Подобные географические и этнические параллели в популяционных спектрах сигналов отбора были выявлены неоднократно и указывают на существенность вклада общих предковых компонентов в адаптацию популяций к условиям среды обитания. По результатам использования геномных тестов сформирован список регионов и генов, подвергшихся действию естественного отбора в исследованных популяциях; подтверждены позиции ряда ранее обнаруженных сигналов и выявлено большое количество новых регионов-

кандидатов. Несмотря на неоднозначность результатов проведенных тестов на обогащенность тех или иных биологических процессов выявленными генами-кандидатами, среди последних отмечено присутствие значительного количества генов, которые связаны с функционированием нервной системы и поведением (NRG3, NBEA, SEMA6A и др.). В целом, полученные данные существенно расширяют имеющуюся мировую базу данных следов действия естественного отбора в геноме человека и могут быть использованы для изучения геном-феномных взаимосвязей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00635).

**Публикации Отдела молекулярных основ генетики
человека:**

1. Dergunova LV, Filippenkov IB, Stavchansky VV, Denisova AE, Yuzhakov VV, Mozerov SA, Gubsky LV, Limborska SA. Genome-wide transcriptome analysis using RNA-Seq reveals a large number of differentially expressed genes in a transient MCAO rat model. BMC Genomics (2018) 19(1):655.
2. Filippenkov IB, Kolomin TA, Limborska SA, Dergunova LV. Developmental stage-specific expression of genes for sphingomyelin synthase in rat brain. Cell and Tissue Res (2018) 372(1):33-40.
3. Filippenkov IB, Sudarkina OY, Limborska SA, Dergunova LV. Multi-step splicing of sphingomyelin synthase linear and circular RNAs. Gene (2018); 654:14-22.
4. Krūmina A, Pliss L, Zarina G, Puzuka A, Zarina A, Lace B, Elferts D, Khrunin A, Limborska S, Klovins J, Gailīte (Piekuse) L. Population Genetics of Latvians in the Context of Admixture between North-Eastern European Ethnic Groups // Proc. Latvian Acad. Sci., Section B. 2018;72(3):131-151.
5. Ruderfer DM, Ripke S, McQuillin A, Boocock J, Stahl EA, Pavlides JMW, Mullins N, Charney AW, ... Khrunin AV, ... Limborska SA, ... Slominsky PA, ... Nurnberger JI, Andreassen OA, Lee SH, O'Donovan MC, Sullivan PF, Ophoff RA, Wray NR, Sklar P, Kendler KS. Genomic Dissection of Bipolar Disorder and Schizophrenia, Including 28 Subphenotypes // Cell. 2018;173(7):1705-1715.e16.
6. Ni G, Moser G, ... Khrunin AV, ... Limborska SA, ... Slominsky PA, ... Wray NR, Lee SH. Estimation of Genetic Correlation via Linkage Disequilibrium Score Regression and Genomic Restricted Maximum Likelihood // Am J Hum Genet. 2018;102(6):1185-1194.

7. Brainstorm Consortium, Anttila V, Bulik-Sullivan B, Finucane HK, Walters RK, Bras J, Duncan L, Escott-Price V, Falcone GJ, Gormley P, ... Khrunin AV, ... Limborska SA, ... Slominsky PA, ... Corvin A, Neale BM, Schott JM, Anney R, Elia J, Grigoriou-Serbanescu M, Edenberg HJ, Murray R. Analysis of shared heritability in common disorders of the brain // *Science*. 2018;360(6395). pii: eaap8757.
8. Ni G, Gratten J, Wray NR, Lee SH, ... Khrunin AV, ... Limborska SA, ... Slominsky PA, ... Weinberger DR, Wendland JR, Werge T, Daly MJ, Sullivan PF, O'Donovan MC. Age at first birth in women is genetically associated with increased risk of schizophrenia // *Sci Rep*. 2018; 8(1):10168.
9. Dergunov A., Litvinov D. , Bazaeva E., Dmitrieva V., Nosova E. , Rozhkova A., Dergunova L. // Relation of HDL charge heterogeneity, cholesterol efflux capacity and the expression of HDL-related genes in mononuclear cells to HDL-cholesterol level. // *Lipids*, 2018. Volume 53, Issue 10, 979-991.
10. Khrunin A, Moisseev A, Gorbunova V, Limborska S. Ethnic differences in susceptibility to the effects of platinum-based chemotherapy. In: *Ovarian cancer*. Devaja O, Papadopoulos AJ (Eds.). InTech - Open Access Company, 2018, p. 309-329.
11. И.Б. Филиппенков, С.А. Лимборская, Л.В. Дергунова. Особенности функционирования некодирующих РНК в норме и при ишемии головного мозга. *Гены & Клетки* Том XIII, № 1, 2018, с.42-46.
12. А.Е. Денисова, И.Б. Филиппенков, В.В. Ставчанский, Л.В. Дергунова, С.А. Лимборская, Л.В. Губский. Биологические эффекты глипролинов меланокортинового ряда. *Фарматека* № 5, 2018, с.26-30.
13. И.Б. Филиппенков, В.В. Ставчанский, А.Е. Денисова, К.А. Иванова, С.А. Лимборская, Л.В. Дергунова. Экспериментальная церебральная ишемия влияет на экспрессию циклических РНК генов метаболитных глутаматных рецепторов mGluR3 и mGluR5 в мозге крыс. *Биоорганическая химия*, 2018, том 44, №3, 294-302.
14. Аширбеков Е.Е., Хрунин А.В., Ботбаев Д.М., Белкожаев А.М., Абайлдаев А.О., Рахымгожин М.Б., Мукушкина Д.Д., Лимборская С.А., Айтхожина Н.А. Молекулярно-генетический анализ популяционной структуры казахского племенного объединения старший жуз на основе полиморфизма Y-хромосомы // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2018. №2. С.72-75.
15. Дмитриева В.Г., Савушкин Е.В., Зуйкова Е.Б., Носова Е.В., Литвинов Д.Ю., Дергунов А.Д., Лимборская С.А., Дергунова Л.В. // Формирование списка генов, функционирующих в клетках крови

человека, вовлечённых в атерогенез и метаболизм липопротеинов высокой плотности. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2018; Т.36, № 2, р.67-71.

16. Н. Ю. Глазова, Е. А. Себенцова, Д. М. Манченко, Л. А. Андреева, Л.В. Дергунова, Н.Г. Левицкая, С.А. Лимборская, Н. Ф. Мясоедов.// Протекторное действие семакса в модели вызванных стрессом нарушений памяти и поведения у белых крыс // Известия Российской академии наук, 2018, № 4, с. 431-437.

17. Хрунин А.В., Алиев А.М., Лимборская С.А. Маркеры ДНК из полногеномных ассоциативных исследований сердечно-сосудистых заболеваний // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2018. № 4. С. 203-205.

ПОЛНОЭКЗОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ В ИЗУЧЕНИИ ПАТОГЕНЕЗА МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ И МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: НЕРЕШЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ

П.А. Сломинский

Лаборатория молекулярных основ наследственных заболеваний

Болезнь Паркинсона (БП) - многофакторное заболевание с выраженным генетическим компонентом, для которого характерно существование как семейных, так и спорадических форм. Выявлен ряд генов, мутации в которых приводят к развитию заболевания. Однако известные гены и описанные в них мутации не могут объяснить все случаи БП. Анализ всех имеющихся работ по изучению семейной формы БП указывает на то, что на долю моногенных форм БП приходится не более 10% всех случаев, в то время как ожидаемая величина количества случаев, объясняемых с генетической точки зрения, составляет 27-40%. В связи с этим целесообразно продолжать поиск и идентификацию генов и мутаций, приводящих к развитию моногенных форм БП. Целью работы является идентификация новых генетических факторов, вовлеченных в патогенез БП с использованием полноэкзомного NGS секвенирования. Для этого на платформе Illumina HiSeq 2500 было проведено полноэкзомное NGS секвенирование ДНК 48 пациентов с исключенными частыми мутациями и предполагаемой аутосомно-доминантной формой БП.

Оценку полученных данных проводили с использованием баз данных dbSNP версии 137, проекта «1000 геномов» и проекта по секвенированию экзона (ESP). Возможная патогенетическая значимость всех выявленных новых или редких несинонимичных гетерозиготных вариантов оценивалась с использованием базы данных dbNSFP v2.9, дополнительное аннотирование проводили при помощи программ Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) и Rare Exome Variant Ensemble Learner (REVEL). Функциональная оценка отобранных проаннотированных вариантов проводилась биоинформатически с использованием базы данных Pathway Studio (Elsevier, США). В результате нами был разработан комбинированный подход для анализа данных, полученных в ходе проведения NGS для неродственных пациентов с предполагаемой аутосомно-доминантной семейной формой БП. Этот подход позволил провести эффективный поиск потенциально патогенетически значимых вариантов путем существенного сокращения круга поиска с 7082 до 25 вариантов в 23 генах и отобрать восемь наиболее значимых генов (FXN, MFN2, MYOC, NPC1, PSEN1, RET, SCN3A and SPG7), которые могут быть связаны с развитием болезни Паркинсона.

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) является самым распространённым вариантом кардиомиопатий и встречается в общей популяции с частотой 1:500. ГКМП служит основной причиной внезапной сердечной смерти, в первую очередь в молодом возрасте, и особенно у молодых спортсменов. Современные эпидемиологические исследования недооценивают распространённость ГКМП. Это связано, прежде всего, с тем, что даже в семьях с наследственной ГКМП наблюдаются сильно варьирующие пенетрантность и экспрессивность заболевания. ГКМП с генетической точки зрения является крайне гетерогенным заболеванием. При этом, несмотря на многолетние исследования, до сих пор не выявлены все гены, которые могут быть связаны с патогенезом ГКМП. Нами проведено таргетное NGS секвенирование 241 гена, которые связаны с функционированием сердечно-сосудистой системы, у 50 пациентов с гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП). В результате проведенного анализа, в целом было выявлено 544 миссенс и нонсенс вариантов в кодирующей области анализируемых генов. Анализ 9 основных генов ГКМП (MYBPC3, MYH7, TNNT2, MYL2, MYL3, TPM1, ACTC1, TNNI3, CSRП3) позволил выявить семь полиморфных вариантов, из которых три варианта в настоящее время

считаются мутациями с доказанной патогенетической значимостью - Gln1233Ter (2 пациента) и Tyr847Ter (1 пациент) в гене MYBPC3 и Gly741Arg (1 пациент) в гене MYH7, а также 4 варианта с потенциально патогенетической значимостью, которые встречаются крайне редко, но в настоящее время также рассматриваются как мутации, приводящие к развитию ГКМП: Glu619Lys (1 пациент) и Val896Met (2 пациента) в гене MYBPC3, Arg285Cys (2 пациента) в гене TNNT2 и Ala13Thr (1 пациент) в гене MYL2. Частота встречаемости мутаций в основных генах ГКМП у наших больных составляет 20%. Анализ полиморфных вариантов в других секвенированных генах показал, что только два варианта прошли все этапы отсева: p.C282Y (три пациента) в гене HFE и p.R518C (один пациент) в гене SACS1A. Кроме того было выявлено еще 18 полиморфных локусов в 17 генах (ABCG5, GAA, KCNE2, LPL, RANGRF, RYR1, TBX5, TRIM63, TRPM4, TNN, ACTN2, CRYAB, GLA, ILK, LDB3, MYO6, VCL), которые не прошли все стадии отсева, но по крайней мере по двум из четырех используемых биоинформатических программ они были квалифицированы как патогенетически значимые. В связи с этим необходимо проводить дальнейший анализ этих вариантов, для установления их роли в развитии гипертрофической кардиомиопатии.

Публикации Лаборатории молекулярных основ наследственных заболеваний:

1. Shadrina M, Bondarenko EA, Slominsky PA. Genetics Factors in Major Depression Disease. Front Psychiatry. 2018 Jul 23;9:334. doi: 10.3389/fpsy.2018.00334. eCollection 2018. Review.
2. Shulskaya, M.V., A.Kh. Alieva, I.N. Vlasov, V.V. Zyrin, E.Y. Fedotova, N.Y. Abramychova, T.S. Usenko, A.F. Yakimovsky, A.K. Emelyanov, S.N. Pchelina, S.N. Illarionkin, P.A. Slominsky, M.I. Shadrina, "Whole-exome sequencing in searching for new variants associated with the development of Parkinson's disease". Frontiers in Aging Neuroscience, 2018, 10(136). doi: 10.3389/fnagi.2018.00136.
3. A.Kh. Alieva, V.V. Zyrin, A.A. Kolacheva, M.M. Rudenok, M.V. Shulskaya, P.A. Slominsky, M.V. Ugrumov, M.I. Shadrina, "Whole transcriptome analysis of mouse models with MPTP-induced early stages of Parkinson's disease reveals stage-specific response of transcriptome and a possible role of myelin-linked genes in neurodegeneration." Molecular Neurobiology, 2018, doi:10.1007/s12035-018-0907-1.

4. Shulskaia MV, Shadrina MI, Bakilina NA, Zolotova SV, Slominsky PA. The spectrum of SDHD mutations in Russian patients with head and neck paraganglioma. *Int J Neurosci.* 2018 Oct 30:1-6. doi: 10.1080/00207454.2018.1503181.
5. Ruderfer DM, Ripke S, McQuillin A, Boocock J, Stahl EA, Pavlides JMW, Mullins N, Charney AW, ... Khrunin AV, ... Limborska SA, ... Slominsky PA, ... Nurnberger JI, Andreassen OA, Lee SH, O'Donovan MC, Sullivan PF, Ophoff RA, Wray NR, Sklar P, Kendler KS. Genomic Dissection of Bipolar Disorder and Schizophrenia, Including 28 Subphenotypes./ *Cell.* 2018;173(7):1705-1715.e16. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.046.
6. Ni G, Moser G, ... Khrunin AV, ... Limborska SA, ... Slominsky PA, ... Wray NR, Lee SH. Estimation of Genetic Correlation via Linkage Disequilibrium Score Regression and Genomic Restricted Maximum Likelihood. *Am J Hum Genet.* 2018;102(6):1185-1194. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.03.021.
7. Brainstorm Consortium, Anttila V, Bulik-Sullivan B, Finucane HK, Walters RK, Bras J, Duncan L, Escott-Price V, Falcone GJ, Gormley P, ... Khrunin AV, ... Limborska SA, ... Slominsky PA, ... Corvin A, Neale BM, Schott JM, Anney R, Elia J, Grigoriou-Serbanescu M, Edenberg HJ, Murray R. Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science.* 2018;360(6395). pii: eaap8757. doi: 10.1126/science.aap8757.
8. Ni G, Gratten J, Wray NR, Lee SH, ... Khrunin AV, ... Limborska SA, ... Slominsky PA, ... Weinberger DR, Wendland JR, Werge T, Daly MJ, Sullivan PF, O'Donovan MC. Age at first birth in women is genetically associated with increased risk of schizophrenia. *Sci Rep.* 2018;8(1):10168. doi: 10.1038/s41598-018-28160-z.
9. Dorokhov V.B., Puchkova A.N., Taranov A.O., Slominsky P.A., Tupitsina T.V., Ivanov I.D., Vavilin V.A., Nechunaev V.V., Kolomeichuk S.N., Morozov A.V., Budkevich E.V., Budkevich R.O., Dementienko V.V., Sveshnikov D.S., Donskaya O.G., Putilov A.A. An hour in the morning is worth two in the evening: association of morning component of morningness–eveningness with single nucleotide polymorphisms in circadian clock genes. *Biological Rhythm Research.* 2018. T. 49. № 4. C. 622-642.
10. Dorokhov V.B., Puchkova A.N., Taranov A.O., Ermolaev V.V., Tupitsyna T.V., Slominskii P.A., Dementienko V.V. Gene polymorphisms associated with sleep and cognitive functions and their associations with accident proneness in shift-working bus drivers. *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2018. T. 48. № 4. C. 448-452. DOI: 10.1007/s11055-018-0585-5.

11. Чемерис Д.А., Сагитов А.М., Аминев Ф.Г., Луценко В.И., Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Василев Р.Г., Алексеев Я.И., Сломинский П.А., Хуснутдинова Э.К., Чемерис А.В. Эволюция подходов к днк-идентификации личности. Биомика. 2018. Т. 10. № 1. С. 85-140.
12. Кимельфельд Е., Кольцова Е., Петрова Е., Гудкова В., Стаховская Л., Тупицына Т., Бондаренко Е., Сломинский П., Лимборская С. Ассоциация генов системы гемостаза с развитием ишемического инсульта у пациентов моложе 50 лет. Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова, 2018;118(9. вып. 2):14-21. doi: 10.17116/jnevro201811809214.
13. Сломинский П.А., Шадрин М.И. Пептидные лекарственные средства: возможности, перспективы, ограничения. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2018. № 1. С. 8-14.
14. Бондаренко Е.А., Шадрин М.И., Дружкова Т.А., Акжигитов Р.Г., Гуляева Н.В., Гехт А.Б., Сломинский П.А. Исследование ассоциаций полиморфизма rs10462021 гена циркадной системы PER3 в выборках лиц с различными клиническими вариантами депрессии. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2018. № 1. С. 23-25.

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

Н.Ф. Мясоедов

Отдел химии физиологически активных веществ (ОХФАВ)

Регуляторные пептиды, их метаболиты и активные короткие фрагменты контролируют практически все физиологические функции организма, оказывая нейромедиаторное и нейромодулирующее влияние на процессы обучения, памяти, сна, поведения, эмоционального состояния человека и животных, регулируют деятельность иммунной системы.

В 2018 году продолжены исследования в области химии и биологии пептидов, как основы для создания новых лекарственных препаратов пептидной природы.

Проведенные исследования включали оптимизацию структуры пептидов на основе ранее развитых подходов. При выполнении работ

проведен синтез, анализ и исследования физико-химического и физиологического действия синтезированных пептидов, фрагментов природных пептидов, относящихся к кортиколиберину, глипролину, GHK и другим пептидам, перспективным для создания на их основе в перспективе новых лекарственных препаратов. Разработаны методы синтеза, синтезированы, разработаны хроматографические методы очистки, выделены и охарактеризованы по физико-химическим свойствам новые пептиды. Отработаны условия введения изотопов водорода в производные доксирубина, допамина и серотонина. Используя дегидропролин (Δ Pro), синтезированы ненасыщенные предшественники выше перечисленных соединений. Впервые разработана методика, позволившая синтезировать меченые производные доксирубина, допамина и серотонина с высоким содержанием изотопа водорода.

Продолжено исследование модуляторной активности пептидов в отношении различных нейрорецепторных систем головного мозга. Проведены исследования влияния Pro-содержащих пептидов на характеристики специфических взаимодействий меченных тритием аналогов эндогенных лигандов рецепторов ГАМК и ацетилхолина. Впервые полученные данные косвенно подтверждают отсутствие непосредственного влияния молекул исследуемых пептидов на рецепторы ГАМК, что позволяет выдвинуть предположение о существовании опосредованных механизмов пептидной регуляции рецепторной активности клеток-мишеней и о возможной общности (или частичной общности) биологических механизмов, лежащих в основе регуляторных эффектов исследуемых пептидов и последствиями воздействия внешних стрессогенных факторов.

Начаты исследования по изучению метаболизма *Woc-Gly-Pro-DOPA*, *Z-Gly-Pro-DOPA* под действием ферментных систем. При использовании современных компьютерных моделей показано, что подобные производные серотонина, дофамина и доксирубина повышают вероятность преодоления гемато-энцефалического барьера.

Проведено исследование влияния острой нормобарической неонатальной гипоксии на моторное развитие и состояние глутатионовой системы тканей мозга крыс. Впервые проведена оценка возможности коррекции эффектов неонатальной гипоксии препаратом N-арахидоноилдофамин. Впервые показано, что

субхроническое введение N-арахидоноилдофамина (NADA) крысам, перенесшим острую неонатальную гипоксию (ОНГ), в значительной степени нормализовало их соматосенсорное развитие. Проведено изучение влияния пренатального введения антидепрессанта флувоксамина на эмоциональное состояние и социальное поведение потомства белых крыс, и проведена оценка функциональной активности системы биогенных аминов мозга крыс, подвергавшихся пренатальному воздействию флувоксамина (ФА).

При проведении работ исследовались отставленные эффекты пренатального воздействия селективного ингибитора обратного захвата флувоксамина (ФА) на потомство белых крыс. Показано, что пренатальное воздействие ФА приводило к увеличению уровня метаболита серотонина 5-ГИУК в гиппокампе крыс в возрасте 2-х месяцев, что свидетельствует об изменении функциональной активности серотонинергической системы мозга крыс.

При выполнении работ впервые получены научные результаты мирового уровня, которые будут опубликованы в научных изданиях и представлены на научных конференциях. Все полученные результаты исследований служат фундаментальной основой для продолжения дальнейших работ по исследованию структуры и функции изучаемых природных пептидов с целью создания в перспективе на их основе новых лекарственных препаратов.

ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ПРИ СТАРЕНИИ И ХРОНИЧЕСКИХ ПАТОЛОГИЯХ: ИССЛЕДОВАНИЯ НА КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ

С.И. Шрам, Ефремова А.С., Недорубова И.А., Мясоедов Н.Ф.
Сектор нейрофармакологии ОХФАВ

Считается, что старение организма во многом связано со снижением с возрастом потенциала различных механизмов, ответственных за поддержание стабильности генома. Важная роль в этих процессах отводится системе поли(АДФ-рибозил)ирования белков. Обнаружено активное участие поли(АДФ-рибоза)-полимераз (PARPs), особенно PARP-1 и PARP-2, в механизмах репарации повреждений ДНК. При этом эффективность репарации ДНК в клетке во многом обусловлена скоростью обнаружения поли(АДФ-рибоза)-

полимеразами повреждений ДНК и интенсивностью реакции поли(ADP-рибозил)ирования белков в выявленных сайтах ДНК. С другой стороны, излишняя перманентная активация PARP-1/2 в условиях патологии оказывает негативное воздействие на клетку, истощая запасы NAD и ATP, запуская механизмы клеточной гибели и способствуя экспрессии провоспалительных факторов. Нами предложен оригинальный метод оценки активности PARP-1/2 в живых клетках, позволяющий количественно оценивать функциональные показатели системы поли(АДФ-рибозил)ирования белков, отражающие способность PARP-1/2 реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК и соотношение «активированного» и «резервного» пулов молекул PARP-1/2 в клетке. Впервые была изучена временная динамика изменения экспрессии и активности поли(ADP-рибоза)-полимераз и связанных с ней показателей при воспроизведении характерных для старения процессов на клеточной модели «стационарного старения». Показано, что с возрастом культур покоящихся фибробластоподобных клеток BII-dii-FAF28 происходит постепенное снижение способности поли(ADP-рибоза)-полимераз реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК, и что это связано с сокращением «резервного» пула молекул PARP-1/2. При этом с возрастом наблюдали значительное увеличение экспрессии генов *Parp1* и *Parp2*. Ревизия данных, полученных другими исследователями на *in vivo* моделях старения, привела к аналогичным выводам. В исследованиях на клеточной модели, воспроизводящей гипергликемический стресс (моделирование диабетической кардиомиопатии в культуре клеток), нами были получены схожие результаты, подтверждающие многочисленные данные об ускорении характерных для старения деструктивных процессов при сахарном диабете. По результатам проведенных исследований предложено рассматривать упомянутые выше функциональные показатели системы поли(АДФ-рибозил)ирования белков в качестве новых биохимических маркеров возрастных процессов, ассоциированных со старением организма. Данные показатели могут быть также использованы для оценки геропротекторной/геропротормонной активности биологически активных веществ в клеточных тест-системах.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01870).

Публикации Отдела химии физиологически активных веществ (зарубежные):

1. Nagaev I.Yu., Shevchenko K.V., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F., Grigoriev V.V., Lavrov M.I., Bondarenko E.V., Kalashnikova E.E. Synthesis of tritium-labeled PAM-43// Mendeleev Commun., 2018, 28 (1), 64-65.
2. Kurenkova A.D., Andreeva L.A., Umarova B.A., Gavrilova S.A., Myasoedov N.F. The Connection Between Structure Modification and Anti-Inflammatory Effects of Prolyl-Glycyl-Proline (PGP)// International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2017, pp 1-7, издательство Springer Verlag (Germany).
3. Savelieva E.M., Oslovsky V.E., Karlov D.S., Kurochkin N.N., Getman I.A., Lomin S.N., Sidorov G.V., Mikhailov S.N., Osolodkin D.I., Romanov G.A. Cytokinin activity of N6-benzyladenine derivatives assayed by interaction with the receptors in planta, in vitro, and in silico//Phytochemistry, 2018, Volume 149, May 2018, Pages 161-177.
4. Sukhanova Iu. A., Sebentsova E. A., Khukhareva D. D., Manchenko D. M. Glazova N. Yu., Vishnyakova P. A., Inozemtseva L. S., Dolotov O. V., Vysokikh M. Y., Levitskaya N. G. Gender-dependent changes in physical development, BDNF content and GSH redox system in a model of acute neonatal hypoxia in rats// Behavioural Brain Research, 350, 87-98.
5. Vyunova TV, Andreeva L, Shevchenko K, Myasoedov N. Peptide-based anxiolytics: the molecular aspects of heptapeptide Selank biological activity//2018, Protein & Peptide Letters, Sep 25, 25,10, 914-923.

В российских журналах - 17 статья

В иностранных журналах - 5 статей

Получено патентов российских - 3

**БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ И РЕКОНСТРУКЦИЯ
ПРОЦЕССОВ ЭВОЛЮЦИИ АЛЬФОИДНЫХ ДНК ПРИМАТОВ**

А.А. Александров

Лаборатория биоинформатики

В общем плане в нашей работе впервые разработана модель эволюции центромер, подтвержденная картиной эволюции приматов,

установленной на основе палеонтологических данных. Выявлены схемы эволюции центромер всех хромосом человека, определена структура и эволюционное происхождение прицентромерных слоев гетерохроматина.

Показана роль периодической смены центромер приматов в видообразовании.

Исследовано эволюционное родство современного человека с неандертальцем и «денисовским человеком». Показано, что по спектру альфоидных повторов можно проводить идентификацию личности.

В 2018 г. осуществлено построение модели рождения новых центромерных слоев из старых для четвертого семейства альфа-сателлитов человека.

Ранее нами (совместно с ИОГен РАН) было показано, что четвертое семейство SF4 альфа-сателлита человека можно разделить на несколько слоев, различающихся по составу и возрасту. В ходе настоящей работы на основе анализа геномной сборки hg38 и WGS было более полно изучено SF4. Всего выделено 11 слоев SF4 (12 субтипов мономеров), последовательно нарастающих в центромере и, предположительно, сменявших друг друга в качестве живой центромеры в человеческой линии. Слои картированы. Карты доступны в пользовательском треке геномного браузера UCSC. Определены гаплотипы слоев. На основе анализа гаплотипов предложена схема эволюции слоев, когда последующий слой возникает на базе предыдущего путем появления и амплификации нескольких фиксированных мутаций. Смена слоя происходит каждые 4 млн. лет. Начата работа по определению индивидуального полиморфизма SF4. Данные по такому полиморфизму дадут возможность определить случаи крупных делеций прицентромерного хроматина, который может повлечь за собой т.н. “разлитие” центромеры на прилегающую область и, как следствие, изменение статуса затрагиваемых генов.

Публикации Лаборатории биоинформатики:

1. Особенности распределения мотивов РНК узнающих белков для протяженных генов 15 хромосомы Homo sapiens. Доклады Международной конференции “Математическая биология и

биоинформатика". Под ред. В.Д. Лахно. Том 7. Пущино: ИМПБ РАН, 2018. Статья № е60. doi: 10.17537/icmbb18.48.

2. Secondary structure of pre-mRNA introns for genes in the 15q11-12 locus. Mapping of functionally significant motifs for RNA-binding proteins and nucleosome positioning signals. Journal of Biomedical Research and Reviews. 2018. V1. N2. PP.58-77. doi.org/10/1101/409243.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМАМИ

И.А. Хмель, В.А. Плюта, О.А. Кокшарова

Лаборатория регуляции экспрессии генов микроорганизмов

Основная тематика исследований Лаборатории в 2018 г. была посвящена изучению биологической активности и механизмов действия летучих органических соединений (ЛОС), образуемых микроорганизмами. Известно, что бактерии и грибы синтезируют огромное количество ЛОС различной химической природы. Представлена база данных ЛОС, образуемых бактериями и грибами, включающая больше 2000 идентифицированных ЛОС, что не исчерпывает, конечно, всех природных ЛОС. В последние годы феномен синтеза ЛОС микроорганизмами вызывает огромный интерес исследователей как новый, мало изученный аспект конкурентных отношений микроорганизмов и их взаимодействия с высшими организмами. Еще одно направление исследований ЛОС связано с их участием в дистанционной коммуникации бактерий. Кроме большого фундаментального значения, исследования ЛОС микроорганизмов могут обеспечить перспективы их использования на практике. Многочисленные ЛОС, образуемые бактериями и часто не идентифицированные, являются важным арсеналом новых химических соединений, которые могут быть полезными в сельском хозяйстве, медицине, биотехнологии. Однако, несмотря на большой интерес к летучим соединениям микроорганизмов, их биологические активности, механизмы действия и биосинтеза, генетическая регуляция синтеза ЛОС изучены слабо и только в отношении некоторых из них.

В 2018 г. были получены следующие основные результаты.

1). Определено действие ЛОС различной химической природы, выделяемых бактериями и грибами, на бактерии. Объектами наших исследований были ЛОС, представители различных групп химических соединений, часто образуемые микроорганизмами - спирты (изоамиловый спирт, 2-фенилэтанол), кетоны (2-бутанон, 2-пентанон, 2-октанон, бета-ионон – ненасыщенный кетон), терпен лимонен. Наиболее детально было исследовано действие ЛОС на фитопатогенные бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, наносящие серьезный ущерб сельскому хозяйству. Показано, что из перечисленных ЛОС самое сильное убивающее действие на клетки грамотрицательных бактерий оказывали кетон 2-октанон и изоамиловый спирт; гораздо слабее указанные ЛОС влияли на грамположительные бактерии.

2). При исследовании действия ЛОС на цианобактерии была завершена работа по изучению бактерицидного действия ЛОС кетонов 2-нонанона и 2-ундеканона на фотосинтетическую активность *Synechococcus* sp. PCC 7942. Впервые было показано, что кетоны ингибируют *in vivo* транспорт электронов через систему PSII в цианобактериях. Добавление кетонов уменьшает квантовый выход первичных фотореакций PSII и изменяет индукцию флюоресценции хлорофилла. Можно предположить, что именно это действие кетонов является причиной их бактерицидного действия на цианобактерии. На остальные использованные нами бактерии кетоны действовали бактериостатически. Работа выполнялась совместно с сотрудниками Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ.

3). Важной характеристикой действия ЛОС является их влияние на формирование биопленок бактерий. Этот вопрос важен для определения перспектив практического использования ЛОС. Способность патогенных бактерий образовывать биопленки представляет серьезную проблему в медицине, т.к. бактерии, обитающие в сообществах - биопленках, отличаются многократно увеличенной резистентностью (до 1000 раз) к действию антибактериальных агентов по сравнению со свободно живущими бактериями. Образование биопленок фитопатогенными бактериями обуславливает их сохранение и распространение при инфекции растений. В связи с вышесказанным, проблема борьбы с биопленками бактерий стоит остро как в медицине, так и в растениеводстве. Нами впервые были получены данные о действии ЛОС 2-октанона,

изоамилового спирта, бета-ионона на образование биопленок штаммов *A. tumefaciens* различного происхождения и на выживаемость клеток в зрелых биопленках. Более сильное действие оказывал кетон 2-октанон. Выживаемость клеток бактерий в составе зрелых биопленок ЛОС подавляли слабее, чем образование биопленок.

4). Изученные ЛОС оказывали фунгистатическое действие на фитопатогенные грибы, возбудители различных заболеваний растений, подавляя рост мицелия грибов. Наибольший эффект наблюдался при действии кетона 2-октанона и изоамилового спирта. ЛОС нарушали спорообразование исследуемых грибов и влияли на их морфологию.

5). В плане исследования действия ЛОС на фитопатогенные грибы была завершена работа по изучению роли 2-ой системы Quorum Sensing в ингибировании роста грибов ЛОС *Serratia proteamaculans*. Было впервые показано, что инактивация гена *luxS*, приводящая к отсутствию синтеза сигнальной молекулы AI-2, препятствует подавлению роста мицелия грибов *Rhizoctonia solani* и *Helminthosporium sativum*.

6). Впервые получены данные о действии исследованных ЛОС на прорастание семян модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Наиболее сильное подавляющее действие оказывал 2-фенилэтанол, немного слабее было влияние 2-октанона и изоамилового спирта. Существенно слабее действовали β -ионон и лимонен. ЛОС тормозили прорастание семян (появление корешка) и выход первых семядольных листков. При этом терялась зеленая окраска листиков, по-видимому, ЛОС действовали на синтез хлорофилла или вызывали его деградацию.

Проводятся работы по изучению действия ЛОС различной химической природы, образуемых микроорганизмами, на экспрессию генов, отвечающих на окислительный стресс и стрессы, вызванные действием тяжелых металлов.

Таким образом, получены новые приоритетные данные о биологической активности ЛОС, синтезируемых бактериями и грибами, представителей различных классов соединений с различными химическими структурами, не изученных или слабо изученных в этом отношении.

В текущем году продолжались также работы по изучению действия наночастиц на бактерии (совместно с сотрудниками

Института химической физики РАН, рук. д.х.н. Надточенко В.А., и Ecole Polytechnique Fédéral de Lausanne, Switzerland).

Публикации Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов:

1. Popova AA, Rasmussen U, Semashko TA, Govorun VM, Koksharova OA. Stress effects of cyanotoxin β -methylamino-L-alanine (BMAA) on cyanobacterial heterocyst formation and functionality. Environ Microbiol Rep. (Environmental Microbiology Reports) 2018 Jun;10(3):369-377. doi:10.1111/1758-2229.12647.
2. Popova AA, Semashko TA, Kostina NV, Rasmussen U, Govorun VM, Koksharova OA. The Cyanotoxin BMAA Induces Heterocyst Specific Gene Expression in Anabaena sp. PCC 7120 under Repressive Conditions. Toxins (Basel). 2018 Nov 16;10(11). pii:E478. doi: 10.3390/toxins10110478.
3. Rtimi, S.; Konstantinidis, S.; Britun, N.; с соавторами. Extracellular bacterial inactivation proceeding without Cu-ion release: Drastic effects of the applied plasma energy on the performance of the Cu-polyester (PES) samples. Applied Catalysis B-EnvironmentalL. 2018. V. 239. P. 245- 253. DOI: 10.1016/j.apcatb.2018.08.024.
4. Сидорова Д.Е., Липасова В.А., Надточенко В.А., Баранчиков А.Е., Астафьева А.А., Свергуненко С.Л., Кокшарова О.А., Плюта В.А., Попова А.А., Гулин А.А., Хмель И.А. Синтез наночастиц серебра с использованием экстрактов травянистых растений и воздействие наночастиц на бактерии // Биотехнология. 2018. Т. 34, № 1, С. 62–71. DOI : 10.21519/0234-2758-2018-34-1-62-71.
5. Сафронова Н.А., Кокшарова О.А. Бактерия Rhodococcus sp. — потенциальный деструктор детонационных наноалмазов. Российские нанотехнологии. т. 13 № 7-8 с. 88-91.
6. Тимофеева А.В., Ксенофонтов А.Л., Кокшарова О.А. Удаление антимикробных пептидов из водных растворов с помощью углеродных нанотрубок. Российские нанотехнологии 92 2018. Том 13. № 7–8, с.92-96.
7. Попова А.А., Кокшарова О.А., Хмель И.А. Изучение механизмов чувствительности клеток цианобактерии *Synechococcus* SP. PCC 7942 к действию 2-нонанона. В сборнике: Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды. Сборник материалов Годичного собрания Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ-АРГОНАВТОВ

Д.М. Есюнина

Лаборатория биологии РНК и эпигенетики

Представители эволюционно-древнего семейства белков-Аргонавтов найдены у бактерий, архей и эукариот. Общее свойство этих белков – способность связывать короткие «гидовые» нуклеиновые кислоты и использовать их для узнавания и, во многих случаях, расщепления комплементарных мишеней. В эукариотических клетках белки-Аргонавты являются ключевыми компонентами систем РНК-интерференции и участвуют в регуляции экспрессии генов и подавлении активности чужеродных генетических элементов и вирусов. В то же время, функции белков-Аргонавтов прокариот остаются почти не исследованными. В уже опубликованных работах было показано, что прокариотические Аргонавты способны узнавать ДНК-мишени и, предположительно, атаковать чужеродные нуклеиновые кислоты. Однако специфичность действия большинства белков-Аргонавтов прокариот, а также механизмы узнавания и процессинга геномных мишеней с участием этих белков остаются неизвестны.

В нашей работе проведен масштабный биоинформатический анализ белков-Аргонавтов бактерий и архей, выявлены основные типы данных белков и выполнена их детальная классификация. В системах *in vitro* исследованы взаимодействия модельных белков-Аргонавтов бактерий с гидовыми и таргетными нуклеиновыми кислотами. Для нескольких белков изучена специфичность их действия на полногеномном уровне и выявлены предпочтительные локусы-мишени. Показано, что результатом связывания белков-Аргонавтов с геномной ДНК может являться ее деградация в месте связывания. В настоящее время ведется поиск факторов, определяющих такую специфичность действия. В частности, показано, что узнавание определенных геномных мишеней белками-Аргонавтами зависит от процессов репликации и транскрипции. Широкое разнообразие свойств прокариотических белков-Аргонавтов

открывает новые возможности для их использования в биотехнологии и генетической инженерии.

Публикации Лаборатории биологии РНК и эпигенетики:

1. Ryazansky S., Kulbachinskiy A., Aravin A.A. 2018. The Expanded Universe of Prokaryotic Argonaute Proteins. MBio 9: e01935-18.
2. Lisitskaya L., Aravin A.A., Kulbachinskiy A. 2018. DNA interference and beyond: structure and functions of prokaryotic Argonaute proteins. Nat. Commun. 9: 5165.
3. Liu Y, Esyunina D, Olovnikov I, Teplova M, Kulbachinskiy A, Aravin AA, Patel DJ. 2018. Accommodation of Helical Imperfections in Rhodobacter sphaeroides Argonaute Ternary Complexes with Guide RNA and Target DNA. Cell Rep. 24: 453-462.
4. Олина А.В., Кульбачинский А.В., Аравин А.А., Есюнина Д.М. 2018. Белки-аргонавты и механизмы РНК-интерференции у эукариот и прокариот. Биохимия 83: 645-661.

ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК-ПОЛИМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ДНК-ПРАЙМАЗЫ И ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА PrimPol

Болдинова Е.О., Гагаринская Д.И., Бондаренко К.А., Шилкин Е.С., Полтораченко В.А., Макарова Анна В., Макарова Алена В.

Лаборатория механизмов репликации поврежденной ДНК

PrimPol – самая последняя из открытых и наименее изученная ДНК-полимераза человека. По свойствам PrimPol сильно отличается от других ДНК-полимераз и праймазы человека. ДНК-праймазная и ДНК-полимеразная активность PrimPol не достаточно охарактеризованы. Не ясны механизмы переключения/регуляции активности PrimPol.

Было проведено исследование ДНК-полимеразной активности PrimPol на ДНК-матрицах, содержащих распространенные повреждения ДНК: 8-охо-G, АП-сайты, формил урацил (fU), тимидин гликоль (TG), этеноаденин (eA) и Об-me-G. Показано, что PrimPol демонстрирует свойства транслезионной ДНК-полимеразы. PrimPol осуществляет очень эффективный и достаточно точный синтез напротив 8-охо-G и fU — повреждений, вызванных окислительным стрессом. PrimPol также

катализирует синтез через AP-сайты и Об-me-G, но блокируется TG и eA. Ионы Mn^{2+} стимулируют ДНК-полимеразную активность PrimPol на ДНК-матрицах со всеми типами повреждений, включая TG и eA, но снижают точность включения нуклеотидных субстратов. Полученные результаты указывают на важную биологическую роль комбинированной ДНК-праймазной и ДНК-полимеразной активностей PrimPol при репликации кластерных повреждений, которые образуются при действии ионизирующего излучения и окислительном стрессе. Мы предполагаем, что PrimPol может использовать праймазную активность для инициации синтеза ДНК *de novo* при прохождении первого повреждения и ДНК-полимеразную активность при включении dNMP напротив второго повреждения.

Изучена активность PrimPol на ДНК-субстратах с брешью. Показано, что PrimPol с высокой эффективностью застраивает 5-нуклеотидную брешь в ДНК, содержащую или не содержащую повреждение. Впервые обнаружена активность PrimPol по вытеснению цепи ДНК и РНК. Показано, что ионы Mn^{2+} в значительной степени стимулируют активность по вытеснению цепи.

Впервые продемонстрировано функциональное взаимодействие между PrimPol и флэп-эндонуклеазой Fen1. Показано, что Fen1 в значительной степени стимулирует ДНК-полимеразную активность PrimPol на ДНК-субстрате с выступающим одноцепочечным 5'-концом, а также активность PrimPol по вытеснению цепи. Показана кооперация PrimPol и Fen1 при синтезе ДНК с вытеснением цепи *in vitro* и продемонстрирована способность Fen1 к выщеплению флэп-структуры, образованной PrimPol в результате вытеснения цепи. Образование комплекса между PrimPol и Fen1 подтверждено с помощью белок-белковых сшивок и выделением комплекса PrimPol-Fen1 после одновременной экспрессии двух белков в *E. coli*. С помощью делеционного картирования идентифицированы участки PrimPol, предположительно, участвующие в функциональном взаимодействии PrimPol с Fen1.

Впервые продемонстрировано образование комплекса между PrimPol и репликативным фактором PolDIP2 при одновременной экспрессии двух белков в клетках *E. coli* и осуществлено выделение комплекса PrimPol-PolDIP2. Показано, что PolDIP2 в значительной степени стимулирует ДНК-полимеразную активность PrimPol на ДНК-субстрате с выступающим одноцепочечным 5'-концом и активность по

замещению цепи. Митохондриальная форма PolDIP2 с укороченным N-концевым районом в меньшей степени стимулирует активность PrimPol, что указывает на важную роль N-концевого домена PolDIP2 во взаимодействии с PrimPol.

Получен набор «минимальных» вариантов PrimPol с делециями центральной и С-концевой неструктурированных областей, обладающих каталитической активностью. Показано, что укороченные белки PrimPol обладают повышенными ДНК-праймазной и ДНК-полимеразной активностями. Эти варианты могут быть использованы для получения первой структуры PrimPol с доменом цинкового пальца.

Получены ингибирующие аптамеры к PrimPol человека.

Публикации Лаборатории механизмов репликации поврежденной ДНК:

1. Makarova A.V., Boldinova E.O., Belousova E.A., Lavrik O.I. In vitro lesion bypass by human PrimPol // DNA Repair (Amst). 2018, 70:18-24.
2. Boldinova E.O., Ignatov A.V., Kulbachinskiy A.V., Makarova A.V. The active site residues Gln55 and Arg73 play a key role in DNA damage bypass by *S. cerevisiae* Pol η // Scientific Reports, 2018, 8 (1), 10314.

ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ KPN2I

Е.И. Климук, К.В. Северинов

Лаборатория регуляции экспрессии генов мобильных элементов прокариот

Множество видов бактерий и архей используют системы рестрикции-модификации (СРМ) для защиты от вирусов. Кроме этого, СРМ помогают контролировать горизонтальный перенос генов. Открытие первых СРМ произошло около 65 лет назад и придало мощный импульс развитию всей фундаментальной биологии, а расшифровка механизма их действия несколько десятилетий назад привела к быстрому развитию биотехнологии и, возможно, определила тот уровень науки, который достигнут в наше время.

СРМ обычно состоят из генов эндонуклеазы рестрикции (ЭР) и метилтрансферазы (МТ), а также могут содержать ген контроллерного белка (С-белка). СРМ Kpn2I является уникальной во многих аспектах. Транскрипционная регуляция генов системы до сих пор не была изучена. Хотя Kpn2I содержит стандартный набор генов, их организация нетипична. Основное отличие заключается во взаимном расположении генов, кодирующих ЭР и С-белок. Обычно С-белки и ЭР синтезируются с единой бицистронной мРНК, что важно для регуляции синтеза ЭР. В случае СРМ Kpn2I эти два гена транскрибируются отдельно. Гены МТ и С-белка транскрибируются разнонаправленно и разделены коротким межгенным участком. Кроме этого, расположение участка связывания С-белка на ДНК (С-боксы) крайне нетипично (внутри гена, кодирующего С-белок).

Нам удалось охарактеризовать транскрипционную регуляцию этой СРМ и показать, что транскрипция со слабого промотора гена ЭР не зависит от С-белка *in vivo* и *in vitro*. Транскрипция с промотора гена МТ зависит от С-белка. Негативная регуляция активности этого промотора осуществляется путем нарушения взаимодействия района 4 s70-субъединицы с «-35»-элементом промотора, находящимся внутри С-бокса, вследствие связывания С-белка с С-боксом. Ослабление связывания РНКП с промотором гена МТ приводит к перекрестному улучшению связывания с промоторами гена С. Наибольший интерес представляет способ авторегуляции транскрипции с промоторов гена С - она осуществляется путем ингибирования стадии элонгации транскрипции связанным с С-боксом С-белком, служащим механическим барьером на пути РНКП. При этом связывание С-белка с С-боксом приводит к изгибу ДНК на 109 градусов. Этот уникальный механизм регуляции транскрипции нам удалось подтвердить *in vivo*. Мы показали, что связывание С-белка с С-боксом приводит к появлению *gre*-зависимой паузы транскрипции и, соответственно, к снижению уровня экспрессии гена, содержащего С-боксы СРМ Kpn2I. Кроме этого, мы измерили количество коротких РНК, возникающих в результате *gre*-зависимой паузы транскрипции, и показали, что соотношение коротких и полноразмерных РНК сдвигается в сторону коротких РНК в штамме с делециями *greA* и *greB*.

Поскольку ключевым этапом регуляции экспрессии генов СРМ Kpn2I является связывание С-белка с С-боксом с формированием нетипичного для подобных систем ДНК-белкового комплекса, мы определили 3D структуры С-белка СРМ Kpn2I дикого типа и его

мутантных форм, что позволило предположить механизм образования сильного изгиба ДНК в месте связывания С-белка. А эксперименты по ко-кристаллизации С-белка с различными участками С-бокса позволили отобрать ДНК, комплексы с которой способны формировать кристаллы и решить структуру нескольких таких ДНК-белковых комплексов.

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

1. Krivoy A, Rutkauskas M, Kuznedelov K, Musharova O, Rouillon C, Severinov K, Seidel R. Primed CRISPR adaptation in Escherichia coli cells does not depend on conformational changes in the Cascade effector complex detected in Vitro. *Nucleic Acids Res.* 2018 Mar 27. 46(8):4087-4098. doi: 10.1093/nar/gky219.
2. Shmakov SA, Makarova KS, Wolf YI, Severinov KV, Koonin EV. Systematic prediction of genes functionally linked to CRISPR-Cas systems by gene neighborhood analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Jun 5;115(23):E5307-E5316. doi: 10.1073/pnas.1803440115.
3. Klimuk E, Bogdanova E, Nagornykh M, Rodic A, Djordjevic M, Medvedeva S, Pavlova O, Severinov K. Controller protein of restriction-modification system Kpn2I affects transcription of its gene by acting as a transcription elongation roadblock. *Nucleic Acids Res.* 2018 Nov 16;46(20):10810-10826. doi: 10.1093/nar/gky880.
4. Radovic M, Killelea T, Savitskaya E, Wettstein L, Bolt EL, Ivancic-Bace I. CRISPR-Cas adaptation in Escherichia coli requires RecBCD helicase but not nuclease activity, is independent of homologous recombination, and is antagonized by 5' ssDNA exonucleases. *Nucleic Acids Res.* 2018 Nov 2;46(19):10173-10183. doi:10.1093/nar/gky799.
5. Musharova O, Vyhovskiy D, Medvedeva S, Guzina J, Zhitnyuk Y, Djordjevic M, Severinov K, Savitskaya E. Avoidance of Trinucleotide Corresponding to Consensus Protospacer Adjacent Motif Controls the Efficiency of Prespacer Selection during Primed Adaptation. *MBio.* 2018 Dec 4;9(6). pii: e02169-18. doi:10.1128/mBio.02169-18.

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЙ КОМПОНЕНТОВ МИКРОБИОТ ЧЕЛОВЕКА

В.В. Демкин

Центр клеточных и генных технологий (ЦКП)

Целью изучения вагинальной микробиоты человека являлось определение основных закономерностей формирования видового разнообразия лактобактерий на фоне возрастных, региональных, и клинических показателей, отражающих состояние женского здоровья. Определение бактериального состава вагинального микробиоценоза проводили методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием разработанных ранее оригинальных тест-систем. В результате выполненных исследований проведена оценка аналитических характеристик панели тест-систем для определения общего содержания и видового типирования вагинальных лактобактерий, отработаны алгоритмы нормирования количественных показателей содержания лактобактерий. На большой выборке урогенитальных проб (более 600 образцов) изучены особенности видового разнообразия доминирующей микрофлоры, в первую очередь лактобактерий. Биоразнообразие лактобактерий в вагинальных микробиотах женщин европейской части России ограничивалось небольшим числом видов, среди которых доминировали *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* и *L. jensenii*. Другие виды лактобактерий встречались крайне редко лишь как минорные компоненты. От 10 до 20% лактоположительных образцов содержали от 2 до 3-х видов лактобактерий. На основании распределения доминирующих видов лактобактерий вагинальные микробиоты российских женщин были классифицированы на 3 кластера с доминированием *L. crispatus*, *L. iners*, или *L. gasseri*. Доминирование *L. crispatus* было ассоциировано с нормальной микрофлорой, доминирование *L. iners* - с вагинальным дисбиозом, выражающимся сниженным содержанием лактобактерий. Видовое разнообразие доминирующих лактобактерий, характерное для российских женщин, в целом соответствовало таковому у женщин, проживающих в других регионах планеты. Не было обнаружено корреляций между доминированием отдельных видов лактобактерий и возрастом, беременностью, и регионом проживания женщин. Полученные данные формируют методическую базу для разработки новых

методов диагностики влагалищных дисбиозов, открывают новые перспективы для разработки персонифицированных вагинальных пробиотиков.

Публикации Центра клеточных и генных технологий:

1. Демкин В.В. Видовое разнообразие лактобактерий вагинального микробиома: как посмотреть. Молекул. генетика, микробиология и вирусология, 2018; 36(3), стр. 3-12.

**РАЗРАБОТКА ОРГАНИЗМЕННЫХ МОДЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ
Danio rerio ДЛЯ АНАЛИЗА МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ
ОПУХОЛЕВЫХ ПАТОЛОГИЙ И ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ**

С.В. Костров

Лаборатория белковой инженерии
Отдела молекулярно-генетических основ биотехнологии и
белковой инженерии (ОМГОБиБИ)

На основе развивающихся эмбрионов *Danio rerio* разработан набор экспериментальных моделей организменного уровня, предназначенных для анализа генетических и клеточных механизмов, вовлеченных в развитие патологических процессов. С использованием этих моделей проанализирована динамика персистенции клеток человека, в том числе опухолевых, в организме развивающихся эмбрионов. Показано, что временное окно, в течение которого клетки опухолевого ксенотрансплантата поддерживаются в теле эмбриона составляет от 4 до 6 дней. Эти данные позволили отработать технику количественной оценки метастатического потенциала опухолей человека на организменном уровне. Начато использование данной модели для анализа влияния ряда мастер-генов на способность опухолей различного генеза к метастазированию.

Проведен сравнительный анализ эффективности функционирования на организменном уровне экспрессионных кассет, интегрированных в состав плазмидного вектора, а также вектора на основе ПЦР-амплификата, при их введении в развивающийся эмбрион. Для оценки количества клеток *Danio rerio*, активно

экспрессирующих трансген, в качестве маркера был использован ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). Анализ динамики накопления GFP-положительных клеток в развивающихся эмбрионах показал, что их количество достигает максимального уровня через двое суток после введения генетических конструкций, независимо от структуры используемого вектора. При этом не выявлено заметных различий в количестве GFP-позитивных клеток, формирующихся при введении в организм экспрессионных конструкций на основе плазмиды и ПЦР-вектора. Необходимо отметить, что формирующиеся GFP-позитивные клетки принадлежат к морфологически различным типам, а их общее количество не превышает нескольких десятков на эмбрион. Таким образом, по-видимому, число присутствующих в эмбрионе клеток, способных акцептировать количество вектора, достаточное для появления детектируемой в условиях эксперимента флуоресценции, относительно невелико.

НОВОЕ СЕМЕЙСТВО БЕЛКОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕАЗ

И.В. Демидюк

Лаборатория функциональной энзимологии
ОМГОБиБИ

Осуществляя ограниченный высокоспецифичный гидролиз белков, в каждой клетке и организме протеазы регулируют множество разнообразных жизненно важных процессов. В связи с этим очевидно, что активность протеолитических ферментов сама должна строго и тонко регулироваться. В такую регуляцию вовлечены различные механизмы, среди которых особую роль занимает селективное ингибирование: некоторые хорошо изученные примеры (матриксные металлопротеазы и их тканевые ингибиторы, каспазы и белки-ингибиторы апоптоза, цистеиновые катепсины и цистатины) демонстрируют, что белковые ингибиторы протеаз могут быть ключевыми факторами, регулирующими активность протеолитических ферментов. Однако, несмотря на важную роль, белковые ингибиторы остаются малоисследованными. За исключением относительно небольшого количества случаев биологические функции ингибиторов остаются невыясненными. Кроме того, драматическое превышение количества известных протеолитических ферментов над количеством

известных белковых ингибиторов протеаз заставляет предполагать, что значительное количество ингибиторов до сих пор не открыто.

В ходе исследований протеализинподобных протеаз (ППП) – группы металлопротеаз, которые по полученным нами ранее и опубликованным другими исследователями данным участвуют во взаимодействии бактерий с высшими организмами и, по-видимому, являются факторами патогенности, нами было обнаружено, гены ППП в геномах бактерий колокализованы с генами небольших гипотетических белков. Поскольку такая ассоциация предполагает общую функцию, мы получили гипотетический белок из *Serratia proteamaculans* в клетках *E. coli* и охарактеризовали его.

Наши исследования показали, что гипотетический белок является эффективным ингибитором ППП, а также других пептидаз, относящихся к семейству M4 ($K_d \sim 50$ нМ). Было продемонстрировано, что у *S. proteamaculans* гены ППП и ингибитора входят в состав оперона, а ингибитор имеет внутриклеточную локализацию. С использованием метода спектроскопии ЯМР была определена пространственная структура ингибитора и установлено, что белок имеет уникальную пространственную укладку (работа выполнена совместно с сотрудниками ИБХ РАН и Курчатковского института). Был проведен биоинформатический анализ и обнаружено, что гомологичные ингибитору из *S. proteamaculans* белки встречаются у тысяч бактерий, относящихся к 11 таксономическим типам. Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что нами открыто новое семейство белковых ингибиторов протеаз.

Ассоциация с ингибиторами нового семейства заставляет пересмотреть представления о функциях ППП у бактерий. На основании результатов нашего исследования, можно предположить, что действие ингибитора направлено на подавление активности ППП, попадающих в бактериальную клетку извне. (Ранее нами было показано, что ППП находятся в клетке-продуценте в неактивной форме.) Тандем протеаза-ингибитор напоминает пары токсин-иммунный белок, характерные для систем, играющих важную роль в межбактериальной конкуренции, таких как, например, система секреции типа VI или система контактного ингибирования роста. Все это приводит к гипотезе об участии ППП не только во взаимодействии бактерий с высшими организмами, но и в конкурентной борьбе бактерий. Таким образом, ППП, вероятно, являются универсальными

инструментами, которые бактерии используют для выживания в разных экологических нишах.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ ИММУННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ОПУХОЛИ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ВЛИЯНИЯ НА ЕЕ ПРОГРЕССИЮ

**А.И. Кузьмич^{1,2}, Д.А. Дидыч², В.В. Плешкан^{1,2},
И.В. Алексеенко^{1,2}**

1 Сектор генной онкотерапии ОМГОБиБи, Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

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

Исследование роли взаимодействий раковых клеток с микроокружением опухоли (МО) в подавлении иммунитета привело к революционной иммунотерапии рака, которая позволяет у ряда пациентов с отдаленными метастазами достигать полной ремиссии. Это определяет необходимость дальнейших исследований взаимодействий раковых клеток с МО, а также возможностей изменения взаимодействий в терапевтических целях, в частности методами генной инженерии. Нами была проведена отработка методов получения нормальных фибробластов и опухоль-ассоциированных фибробластов (ОАФ) мыши. Были получены кокультуры ОАФ и раковых клеток в условиях *in vivo* посредством инокуляции мышам линии BALB/c смеси раковых клеток СТ26 и нормальных фибробластов кожи мыши. На полученных моделях с разным стромальным содержанием была оценена эффективность комплексов, содержащих плазмидную ДНК, несущую ген иммунного коактиватора ОХ40L и блок-сополимер PPT (полиэтиленимин-полиэтиленгликоль) в качестве носителя. Всего было сформировано 4 группы животных: группам А и Б были инокулированы смеси раковых клеток СТ26 и нормальных фибробластов кожи, группам В и Г – только раковые клетки. Далее группы А и В получали лечение комбинацией ОХ40L-PPT, группы Б и Г были контрольными. Было показано, что лечение комбинацией ОХ40L-PPT в группах А и В приводило к значимому торможению роста опухоли (группа А – ТРО 65,4%, группы – ТРО 67%) и увеличению продолжительности жизни животных по

сравнению с контролем, однако в группе А данный противоопухолевый эффект был более выражен (в частности, в группе А у 3-х мышей из 12 была диагностирована полная регрессия опухоли, тогда как в группе В наблюдалось только торможение роста опухоли, но не происходило ее полной элиминации). Возможно, данный эффект связан с экспрессией OX40L в ОАФ или с появлением в опухоли дополнительных сигналов опасности. Для доставки генетических конструкций преимущественно в клетки МО был создан новый рекомбинантный белок H2A-YG2. Он представляет собой гибрид гистона H2A, способного осуществлять связывание плазмидной ДНК и доставку ее в клетки млекопитающих, и линейного пептида YG2, способного селективно связываться с белком PDGFRb, представленным на поверхности многих клеток МО, таких как ОАФ и перicyты. Мы полагаем, что такой гибридный белок будет способен связываться с поверхностью клеток МО, что приведет к усиленной доставке в них генетических конструкций. Было показано, что он, как и гистон H2A, способен связывать плазмидную ДНК и обеспечивать трансфекцию мышинных клеток *in vitro*. Уровень трансфекции клеток линии 3Т3, экспрессирующей *Pdgfrb*, был в несколько раз выше при использовании в качестве носителя H2A-YG2 по сравнению с H2A. Полученные данные будут проверены на других клеточных линиях.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-34-00852) и грантом программы Президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий».

Публикации Отдела молекулярно-генетических основ биотехнологии и белковой инженерии:

1. Dvortsov I.A., Lunina N.A., Chekanovshaya L.A., Gromov A.V., Schwarz W.H., Zverlov V.V., Velikodvorskaya G.A., Demidyuk I.V., Kostrov S.V. Carbohydrate Binding Module CBM28 of Endoglucanase Cel5D from *Caldicellulosiruptor bescii* Recognizes Crystalline Cellulose. // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. V. 107. Part A. P. 305-311.
2. Мизгирев И.В., Сафина Д.Р., Демидюк И.В., Костров С.В. Опухолевые модели организменного уровня на основе *Danio rerio*. // *Acta Naturae*. 2018. Т. 10. № 2. С. 26-31.
3. Юрова М.Н., Сафина Д.Р., Мизгирев И.В. Селективное ингибирование KRAS сигнального каскада при комбинированном

воздействии низких доз рапамицина и паклитаксела *in vivo*. // Успехи молекулярной онкологии. 2018. Т. 5. № 2. С. 42-49.

4. Dvortsov I.A., Lunina N.A., Demidyuk I.V., Kostrov S.V. Disturbed processing of the carbohydrate-binding module of family 54 significantly impairs its binding to polysaccharides. // FEBS Lett. 2018. V. 592. № 20. P. 3414–3420.

5. Heinze S., Zimmermann K., Ludwig C., Heinzlmeir S., Schwarz W.H., Zverlov V.V., Liebl W., Kornberger P. Evaluation of promoter sequences for the secretory production of a *Clostridium thermocellum* cellulase in *Paenibacillus polymyxa*. // Applied Microbiology and Biotechnology. 2018. V. 102. № 23. P. 10147-10159.

6. Herlet J., Schwarz W.H., Zverlov V. V., Liebl W., Kornberger P. Addition of β -galactosidase boosts the xyloglucan degradation capability of endoglucanase Cel9D from *Clostridium thermocellum*. // Biotechnology for Biofuels. 2018. V. 11. P. 238.

7. Broeker J., Mechelke M., Baudrexel M., Mennerich D., Hornburg D., Mann M., Schwarz W.H., Liebl W., Zverlov V.V. The hemicellulose-degrading enzyme system of the thermophilic bacterium *Clostridium stercoarium*: comparative characterisation and addition of new hemicellulolytic glycoside hydrolases. Biotechnology for Biofuels. 2018. V. 11. P. 229.

8. Leis B., Held C., Andreeßen B., Liebl W., Graubner S., Schulte L.P., Schwarz W.H., Zverlov V.V. Optimizing the composition of a synthetic cellulosome complex for the hydrolysis of softwood pulp - identification of the enzymatic core functions and biochemical complex characterization. // Biotechnology for Biofuel. 2018. V. 11. P. 220.

9. Heinze S., Kornberger P., Graetz C., Schwarz W.H., Zverlov V.V., Liebl W. Conjunctive transfer of a new broad host range expression vector to various *Bacillus* species using a single protocol. // BMC Microbiology. 2018. V. 18(1). P. 56.

10. Schwarz W.H., Brunecky R., Broeker J., Liebl W., Zverlov, V.V. Handling gene and protein names in the age of bioinformatics - the special challenge of secreted multimodular bacterial enzymes such as the *cbhA/cbh9A* gene of *Clostridium thermocellum*. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2018. V. 34. P. 42.

11. Pechtl A., Rückert C., Maus I., Koeck D.E., Trushina N., Kornberger P., Schwarz W.H., Schlüter A., Liebl W., Zverlov V.V. Complete genome sequence of the novel cellulolytic, anaerobic, thermophilic bacterium *Herbivorax saccincola* type strain GGR1, isolated from a lab scale biogas

reactor as established by Illumina and Nanopore MinION sequencing. // Genome Announc. 2018. V. 6. № 6. pii: e01493-17.

12. Alekseenko I.V., Pleshkan V.V., Sverdlov E.D. Cancer–stroma interactions as a target for cancer treatment. // Biopolymers and Cell. 2018. V. 34. № 4. P. 271–283.

13. Алексеенко И.В., Плешкан В.В., Сасс А.В., Филюкова О.Б., Снежков Е.В., Сverdlov Е.Д. Универсальный опухолеспецифичный промотор для генной терапии рака. // Доклады академии наук. 2018. Т. 480. № 5. С. 609-612.

14. Алексеенко И.В., Костина М.Б., Серебровская Е.О., Потапов В.К., Сverdlov Е.Д. Сравнительный анализ систем одновременной экспрессии двух онкотерапевтических генов под контролем одного промотора. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2018. Т. 36. № 1. С. 14-18.

15. Безбородова О.А., Алексеенко И.В., Немцова Е.Р., Панкратова А.А., Филюкова О.Б., Якубовская Р.И., Костина М.Б., Потапов В.К., Сverdlov Е.Д. Противоопухолевая эффективность комплекса на основе бинарной системы векторов для совместной экспрессии гена-убийцы Fcu1 и Cre-рекомбиназы. // Доклады академии наук. 2018. Т. 483. № 3. С. 1-3.