

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

**XXVIII ЕЖЕГОДНАЯ НАУЧНАЯ  
КОНФЕРЕНЦИЯ**

**5-6 февраля 2020 г., Москва**

# **ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ**

**5 февраля, среда**

**Утреннее заседание, начало в 10:30**

## **Открытие конференции**

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

### **Председатель – С.В. Костров**

В.А. ГВОЗДЕВ – руководитель Отдела молекулярной генетики клетки (ОМГК). «Герминальные клетки дрозофилы: транспозоны и белки». (25 мин)

Ю.Я. ШЕВЕЛЕВ – зав. Лабораторией анализа регуляции генов ОМГК. «Изменения трехмерной организации хроматина на двух последовательных стадиях сперматогенеза дрозофилы». (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. «Биология теломер в зародышевой линии дрозофилы: связь между структурой хроматина, транскрипцией и целостностью теломерной ДНК». (20 мин)

А.В. КУЛЬБАЧИНСКИЙ – зав. Лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов (ЛМГК) ОМГК. «Регуляция активности бактериальной РНК-полимеразы при транскрипции нормальной и поврежденной ДНК». (20 мин)

М.А. ПЕТРОВА – зав. Сектором анализа и хранения микроорганизмов ЛМГМ ОМГК. «Классификация плазмид, обнаруженных в «древних» штаммах *Acinetobacter lwoffii* и перспективность ее использования для плазмид штаммов всего рода *Acinetobacter*». (15 мин)

А.В. КУЗЬМЕНКО – ст.н.с. Лаборатории биологии РНК и эпигенетики. «ДНК-интерференция и белки-аргонаты в клетках бактерий». (20 мин)

### П е р е р ы в

## Вечернее заседание, начало в 16:00

### **Председатель – А.В. Кульбачинский**

Л.В. ГЕНИНГ – ст.н.с. Лаборатории репликации и репарации генома Отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики (ОВКМГ). «Определение мутагенного потенциала 8-охоG в ядерных экстрактах клеток мыши с помощью метода “обрамленного зеркала”». (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, С.А. ЛИМБОРСКАЯ – Отдел молекулярных основ генетики человека «Сравнительный анализ действия производных меланокортина на транскриптом в условиях острого стресса». (20 мин)

**6 февраля, четверг**

**Утреннее заседание, начало в 10:30**

**Председатель – П.А. Сломинский**

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

Е.А. СЕБЕНЦОВА – н.с. Лаборатории молекулярных основ регуляции поведения ОХФАВ. «Изучение последствий перинатальной гипоксии на модели недоношенной и доношенной беременности». (15 мин)

С.И. ШРАМ – зав. Сектором нейрофармакологии ОХФАВ. «Катионные динитрозильные комплексы железа с S-донорными лигандами - новая группа ингибиторов поли(АДФ-рибоза)полимеразы-1». (15 мин)

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

П е р е р ы в (15 мин)

**Председатель – Е.Г. Пасюкова**

А.В. МАКАРОВА – зав. Лабораторией механизмов репликации поврежденной ДНК. «Попытки получения структуры ДНК-праймазы и ДНК-полимеразы человека PrimPol». (20 мин)

О.С. МУШАРОВА – вед. инженер Лаборатории регуляции экспрессии генов мобильных элементов прокариот. «Определяющие факторы специфичности выбора спейсеров в ходе *crispr* адаптации». (20 мин)

П.А. СЛОМИНСКИЙ – зав. Лабораторией молекулярных основ наследственных болезней. «Таргетное секвенирование и РНК профилирование в изучении патогенеза мультифакториальных и моногенных заболеваний». (20 мин)

### **Вечернее заседание, начало в 15:00**

**Председатель – Ю.Я. Шевелев**

С.В. КОСТРОВ – руководитель Отдела молекулярно-генетических основ биотехнологии и белковой инженерии (ОМГОБиБИ). «Разработка организменных моделей на основе *Danio rerio* для анализа молекулярных и клеточных механизмов развития опухолевых патологий и поиска новых подходов к противораковой терапии». (30 мин)

И.В. ДЕМИДЮК – зав. Лабораторией функциональной энзимологии ОМГОБиБИ. «Новый белковый ингибитор протеаз – гомолог пропептида протеализина». (20 мин)

И.В. АЛЕКСЕЕНКО – зав. Сектором генной онкотерапии ОМГОБиБИ. «Опухоль-ассоциированные фибробласты как внутриопухолевый источник терапевтических молекул». (15 мин)

Заключительное слово директора ИМГ РАН  
члена-корреспондента РАН С.В. КОСТРОВА.

**Заккрытие конференции**

## ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

### ГЕРМИНАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ДРОЗОФИЛЫ: ТРАНСПОЗОНЫ И БЕЛКИ

**Академик В.А. Гвоздев**

Лаборатория биохимической генетики животных  
Отдела молекулярной генетики клетки (ОМГК)

Известно, что подавление транскрипции инсертированных мобильных элементов системой Piwi-piРНК может сопровождаться репрессией примыкающих к ним участков генома. Исследование молекулярной природы этих эффектов представляет значительный интерес с позиций представлений о роли транспозонов в эволюционной изменчивости генома. Белок Piwi, связывающий короткие piРНК, участвует в подавлении транскрипции транспозонов, сканируя их транскрипты и привлекая ряд белков, формирующих гетерохроматин, включая эволюционно консервативный белок HP1. Исследуя процессы инактивации районов эухроматина, прилегающих к разным типам инсертированных транспозонов, мы показали, что в герминальных клетках нокадаун HP1a, но не Piwi, приводит, как правило, к транскрипционной активации прилегающих эухроматиновых флангов. В ряде случаев наблюдалась активация транскрипции кодирующих белки генов. В тоже время, нокадаун HP1 не оказывал влияния на транскрипцию самих транспозонов. Полученные результаты позволяют предполагать, что в герминальных клетках яичников в сайтах инсерций транспозонов без участия системы Piwi-piРНК могут формироваться островки гетерохроматина, которые осуществляют негативную регуляцию экспрессии прилежащих генов в результате распространения белка HP1a.

Классический эволюционно консервативный РНК-связывающий белок герминальных клеток, РНК-хеликаза VASA, рассматривается как регулятор трансляции и участник биогенеза piРНК в этих клетках. Из семенников и яичников мух, экспрессирующих VASA-GFP, получены иммунопреципитаты, обогащенные ассоциированными с VASA мРНК, с целью выявления роли VASA в трансляции ряда герминальных мРНК. Наибольшее обогащение показано для мРНК белка RHINO (в 6000 и в 600 раз в семенниках и яичниках соответственно), являющегося

паралогом белка HP1 и обеспечивающим транскрипцию кластеров, кодирующих предшественники рiPHK. Обнаружение ассоциации VASA с «собственной» мPHK не исключает возможности саморегуляции трансляции. Обнаружено также, что мутации в гене *vasa* сопровождаются снижением содержания в семенниках/яичниках количества герминального белка AUBERGINE в 3-5 раз.

Ранее мы рассматривали семенник-специфичный белок  $\beta$ NACtes как накапливающийся в растущих сперматоцитах и сохраняющийся в элонгирующих сперматидях паралог повсеместно экспрессирующегося белка  $\beta$ NAC. Неожиданно при иммуноокрашивании яичников белок  $\beta$ NACtes вместе с мPHK  $\beta$ NACtes (FISH – гибридизация) был обнаружен исключительно в локальной зоне зрелого яйца, где концентрируются гранулы герминальной плазмы, индуцирующие после оплодотворения дифференцировку и целлюлиризацию дробящихся синтициальных ядер эмбриона с образованием полярных герминальных клеток, содержащих в цитоплазме  $\beta$ NACtes. Полярные клетки - предшественники герминальных клеток особи, и их потомки в виде парных скоплений герминальных примордиальных клеток, содержащих  $\beta$ NACtes, обнаруживаются в процессе эмбрионального развития у обоих полов. Ранее мы показали, что гены  $\beta$ NACtes были приобретены и амплифицированы в процессе эволюции видов дрозофилы. Это позволяет рассматривать  $\beta$ NACtes как маркер герминальных клеток у некоторых видов дрозофил и как фактор, участвующий в развитии и дифференцировке герминальных клеток у этих видов. Трансген, экспрессирующий  $\beta$ NACtes, не способен супрессировать летальность гомозиготных особей с мутацией по вездесущему  $\beta$ NAC или полулетальность транс-гетерозиготных по мутациям особей. Эволюционно молодой белок  $\beta$ NACtes вероятно обладает специфичными биологическими функциями по сравнению со своим повсеместно экспрессируемым паралогом  $\beta$ NAC.

## **ИЗМЕНЕНИЯ ТРЕХМЕРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА НА ДВУХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ СТАДИЯХ СПЕРМАТОГЕНЕЗА ДРОЗОФИЛЫ**

**к.б.н. Ю.Я. Шевелев**

Лаборатория анализа регуляции генов ОМГК

Хромосомы эукариот разделены на топологически ассоциированные домены (ТАДы), часть из которых прикреплена к ядерной ламине в ламина-ассоциированных доменах (ЛАДах). У дрозофилы границы ТАДов коррелируют с присутствием в них генов «домашнего хозяйства». Остается, однако, неясным, приводит ли запуск ткане-специфичной транскрипции к разделению хроматина на ТАДы и к утрате его связи с ядерной ламиной.

Совместно с С.В. Ульяновым, С.В. Разиным (ИБГ РАН), Е.Е. Храмеевой (Сколтех) и С.Н. Белякиным (ИМКБ СО РАН), а также с рядом других коллег методом DamID и Hi-C мы идентифицировали ЛАДы и ТАДы в сперматогониях и сперматоцитах, представляющих герминальные клетки на двух последовательных стадиях сперматогенеза дрозофилы. Мы обнаружили, что подавляющее большинство промоторов повсеместно-экспрессирующихся генов находится в меж-ЛАДах. Однако, только 42% сперматоцит-специфичных промоторов утрачивает связь с ядерной ламиной в сперматоцитах. И наоборот, множество сперматоцит-специфичных промоторов находится вне ЛАДов в клетках, где эти промоторы неактивны. Тем не менее, активация сперматоцит-специфичных промоторов в ТАДах усиливает инсуляцию хроматина в этих участках. Таким образом, запуск ткане-специфичной транскрипции по крайней мере в некоторых случаях приводит к откреплению хроматина от ядерной оболочки и к частичному разделению ТАДов на суб-ТАДы.

Мы также обнаружили, что в сперматогониях и сперматоцитах единственная X хромосома сильнее связана и расположена ближе к ядерной оболочке, чем пары аутосом. При этом, хроматин, находящийся в меж-ЛАДах X хромосомы, оказался более доступен для Dam-метилования, чем хроматин в аутосомных меж-ЛАДах. Более того, в сперматогониях одна доза сперматогоний-специфичного гена-репортера экспрессируется в среднем в 2 раза сильнее, если ген-репортер инсертирован в случайные места X хромосомы, по сравнению с аутосомами. Полученные результаты подкрепляют гипотезу о существовании неканонической дозовой компенсации, оперирующей в сперматогониях.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ КОНТРОЛЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ У ДРОЗОФИЛЫ

**д.б.н. Е.Г. Пасюкова**

Лаборатория геномной изменчивости ОМГК

В докладе будет представлен краткий обзор основных направлений и результатов работы лаборатории в 2019 году. Кроме того, в докладе более подробно будут представлены итоги работы, которая проводится в лаборатории в течение последних лет и посвящена исследованию роли гена *shaggy (sgg)*, кодирующего серинтреониновую протеинкиназу GSK3, в контроле продолжительности жизни. В докладе будут освещены результаты, которые легли в основу трех статей, опубликованных и подготовленных к печати в 2019 году, и обсуждены дальнейшие направления исследования.

GSK3 (glycogen synthase kinase 3) является консервативной протеинкиназой, участвующей в большом числе сигнальных каскадов и обладающей рядом уникальных свойств. Изучение роли гена *sgg* в контроле продолжительности жизни развивалось в нескольких направлениях.

1. Исследование роли дифференциальной экспрессии *sgg* в контроле продолжительности жизни. Было проанализировано влияние уменьшения и увеличения экспрессии четырех транскрипов гена на эмбриональной стадии развития, а также у взрослых мух разного пола и возраста в различных тканях. Оказалось, что характер влияния на продолжительность жизни зависит и от стадии развития, и от пола, и от возраста, а также от ткани и транскрипта гена. В ряде случаев изменение уровня экспрессии *sgg* привело к увеличению продолжительности жизни. В нервной системе только изменение экспрессии основного транскрипта повлияло на продолжительность жизни. Было проанализировано влияние уменьшения и увеличения экспрессии этого транскрипта в отдельных типах нейронов. Оказалось, что изменение экспрессии в мотонейронах и дофаминэргических нейронах приводит к увеличению продолжительности жизни. Продолжая эту линию исследований, в настоящее время мы исследуем роль изменения экспрессии *sgg* в отдельных группах дофаминэргических нейронов в контроле продолжительности жизни.
2. Анализ изменений нервной системы, сопутствующих уменьшению и увеличению продолжительности жизни. Было показано, что сильное

снижение выживания и преждевременное старение сопряжено с серьезным нарушением целостности нейронов; количества, распределения и структуры митохондрий; характеристик цитоскелета; и синаптической активности. Однако некоторые аналогичные изменения могут сопровождать и увеличение продолжительности жизни. Поиск изменений, однозначно сопряженных с увеличением продолжительности жизни, продолжается в настоящее время.

3. Изучение молекулярных механизмов, опосредующих влияние *sgg* на продолжительность жизни. Мы предполагаем, что ускоренное старение, вызванное увеличением экспрессии основного транскрипта *sgg* в нервной системе, связано с изменением белков, определяющих структуру цитоскелета, в частности, белка tau. Мы предполагаем также, что изменение продолжительности жизни при изменении экспрессии *sgg* может быть связано с взаимодействием GSK3 с протенкиназами aPKC и PAR1, являющимися мишенями GSK3. Эти предположения в настоящее время проверяются экспериментально.

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

1. Ulianov SV, Doronin SA, Khrameeva EE, Kos PI, Luzhin AV, Starikov SS, Galitsyna AA, Nenasheva VV, Ilyin AA, Flyamer IM, Mikhaleva EA, Logacheva MD, Gelfand MS, Chertovich AV, Gavrilov AA, Razin SV, Shevelyov YY. Nuclear lamina integrity is required for proper spatial organization of chromatin in *Drosophila*. *Nat. Commun.*, 2019, 10:1176.
2. Shevelyov YY, Ulianov SV. The nuclear lamina as an organizer of chromosome architecture. *Cells*, 2019, 8:135.
3. Ulianov SV, Zakharova VV, Galitsyna AA, Polovnikov KE, Khrameeva EE, Logacheva MD, Mikhaleva EA, Vassetzky YS, Gavrilov AA, Shevelev YY, Nechaev SK, Razin SV. Hi-C analysis of genome folding in individual *Drosophila* cells. *Biopolym. Cell*, 2019, 35:172-172.
4. Sokolova OA, Ilyin AA, Poltavets AS, Nenasheva VV, Mikhaleva EA, Shevelyov YY, Klenov MS. Yb body assembly on the flamenco piRNA precursor transcripts reduces genic piRNA production. *Mol. Biol. Cell*, 2019, 30:1544-1554.
5. Mikhaleva EA, Leinsoo TA, Ishizu H, Gvozdev VA, Klenov MS. The nucleolar transcriptome regulates Piwi shuttling between the nucleolus and the nucleoplasm. *Chromosome Res.*, 2019, 27:141-152.

6. Pirogov SA, Gvozdev VA, Klenov MS. Long noncoding RNAs and stress response in the nucleolus. *Cells*, 2019, 8:668.
7. Kotov AA, Adashev VE, Godneeva BK, Ninova M, Shatskikh AS, Bazylev SS, Aravin AA, Olenina LV. piRNA silencing contributes to interspecies hybrid sterility and reproductive isolation in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.*, 2019, 47:4255-4271.
8. Radion E, Sokolova O, Ryazansky S, Komarov PA, Abramov Y, Kalmykova A. The Integrity of piRNA Clusters is Abolished by Insulators in the *Drosophila* Germline. *Genes (Basel)*, 2019, 10:209.
9. Kuzmenko A, Yudin D, Ryazansky S, Kulbachinskiy A, Aravin AA. Programmable DNA cleavage by Ago nucleases from mesophilic bacteria *Clostridium butyricum* and *Limothrix rosea*. *Nucleic Acids Res.*, 2019, 47:5822-5836.
10. Rybina OY, Schelkunov MI, Veselkina ER, Sarantseva SV, Kremontsova AV, Vysokikh MY, Melentev PA, Volodina MA, Pasyukova EG. Knockdown of the neuronal gene *Lim3* at the early stages of development affects mitochondrial function and lifespan in *Drosophila*. *Mech. Ageing Dev.*, 2019, 181:29-41.
11. Trostnikov MV, Roshina NV, Boldyrev SV, Veselkina ER, Zhuikov AA, Kremontsova AV, Pasyukova EG. Disordered expression of *shaggy*, the *Drosophila* gene encoding a serine-threonine protein kinase GSK3, affects the lifespan in a transcript-, stage-, and tissue-specific manner. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20:2200.
12. Тростников МВ, Веселкина ЕР, Кременцова АВ, Рощина НВ, Пасюкова ЕГ. Инсерционные мутации гена *shaggy*, кодирующего протеинкиназу GSK3, увеличивают продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*. *Генетика*, 2019, 55:1099-1104.

## **БИОЛОГИЯ ТЕЛОМЕР В ЗАРОДЫШЕВОЙ ЛИНИИ ДРОЗОФИЛЫ: СВЯЗЬ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ ХРОМАТИНА, ТРАНСКРИПЦИЕЙ И ЦЕЛОСТНОСТЬЮ ТЕЛОМЕРНОЙ ДНК**

**д.б.н. А.И. Калмыкова**

Лаборатория исследования геномных повторов эукариот

Теломеры представляют собой комплекс нуклеиновых кислот и белков, защищающих концы линейных хромосом эукариот от деградации и слияния. Дисфункция теломер чревата нарушениями

развития, появлением раковых клеток и преждевременным старением. Несмотря на гетерохроматиновую природу теломер, теломерные повторы у всех изученных видов транскрибируются с образованием длинных теломерных РНК. Содержание теломерных РНК в норме поддерживается на низком уровне, а значительная ее фракция удерживается около теломер, формируя внешний каркас. Увеличение уровня транскрипции теломерных повторов сопровождается нарушением стабильности теломер, что подразумевает тесную связь между этими процессами. Мы проводим планомерное исследование факторов стабильности теломер в герминальных тканях *Drosophila*. Для этого мы провели отбор генов, которые негативно регулируют экспрессию теломерного ретротранспозона HeT-A в яичниках дрозофилы. Нами были исследованы несколько уровней регуляции количества теломерных транскриптов. На предыдущих этапах работы было показано, что Piwi-interacting РНК (piРНК) необходимы для поддержания теломерного гетерохроматина и, следовательно, для подавления транскрипции теломерных повторов. Кроме того, обнаружен ко-транскрипционный уровень регуляции теломерных повторов HeT-A с участием ядерного деаденилазного комплекса Ccr4-Not, который локализуется вблизи теломер и обеспечивает деградацию транскриптов основного теломерного повтора HeT-A в ядрах герминальных клеток. Эти данные показывают, что количество теломерных транскриптов регулируется как на транскрипционном, так и на ко-транскрипционном уровне с участием сложной системы ядерного контроля качества РНК. Среди новых негативных регуляторов экспрессии HeT-A в яичниках выявлен РНК-связывающий белок *Ars2*, консервативный регулятор метаболизма РНК. Нокадаун *Ars2* приводит к нарушению теломерного хроматина и снижению продукции теломерных piРНК. Предполагается, что *Ars2* является компонентом теломерного белкового комплекса и осуществляет связь между транскрипцией и состоянием хроматина. Использование конфокальной микроскопии показало, что компоненты piРНК пути, деаденилазного комплекса Ccr4-Not и системы экспорта РНК из ядра колокализуются вблизи теломер с образованием ядерных структур. Нарушение piРНК пути приводит к исчезновению теломерных телец, что указывает на ключевую роль piРНК в привлечение к теломерам ядерных факторов метаболизма РНК. Показано, что активация экспрессии теломерных РНК в процессе оогенеза, вызванная нарушением работы различных

факторов, сопровождается появлением разрывов ДНК в теломерных районах, что может служить одним из сигналов к остановке развития. Таким образом, продемонстрирована тесная связь процессов регуляции транскрипции теломерных повторов и целостности теломер, что важно для нормального развития.

**Публикации Лаборатории исследования геномных повторов эукариот:**

1. М.Кордюкова, А. Калмыкова. Природа и функции теломерных транскриптов. Биохимия, 2019, том 84, вып. 2, с. 212 – 222.
2. E. Radion, O. Sokolova, S. Ryazansky, P. A. Komarov, Y. Abramov, A. Kalmykova. The Integrity of piRNA Clusters is Abolished by Insulators in the Drosophila Germline. Genes 2019, 10(3), 209.
3. M. Kordyukova, O. Sokolova, V. Morgunova, S. Ryazansky, N. Akulenko, S. Glukhov, A. Kalmykova. Nuclear Ccr4-Not mediates the degradation of telomeric and transposon transcripts at chromatin in the Drosophila germline. Nucleic Acids Res. 2019 Nov 14. [Epub ahead of print].

**РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ПРИ ТРАНСКРИПЦИИ НОРМАЛЬНОЙ И ПОВРЕЖДЕННОЙ ДНК**

**д.б.н. А.В. Кульбачинский**

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов ОМГК

Перемещение РНК-полимеразы по матрице ДНК в ходе транскрипции происходит неравномерно, с многочисленными остановками, которые могут быть вызваны сигналами пауз, ошибками в синтезе РНК или наличием в ДНК повреждений. РНК-полимераза является одним из основных сенсоров повреждений ДНК в клетке, привлекая в такие участки факторы репарации. В нашей работе изучаются механизмы, контролирующие остановку транскрипционных комплексов в участках ДНК, содержащих регуляторные сигналы и повреждения различных типов, а также исследуется роль регуляторных белков в узнавании таких участков и координации процессов транскрипции и репарации. Нами показано, что РНК-полимеразы различных бактерий, в том числе, экстремофилов, узнают неканонические и поврежденные нуклеотиды в составе ДНК-матрицы

сходным образом. Установлено, что различные модификации ДНК, нарушающие комплементарные взаимодействия, способны значительно ингибировать транскрипцию, а также снижать точность синтеза РНК. Охарактеризованы мутации в активном центре РНК-полимеразы, которые могут, как снижать, так и увеличивать эффективность транскрипции поврежденных матриц. Изучена роль факторов транскрипции и репарации (Gre-подобные белки, Mfd-транслоказа) в регуляции активности РНК-полимеразы и разборке транскрипционных комплексов в поврежденных участках ДНК. Установлено, что Gre-подобные белки способны не только активировать расщепление РНК в остановленных транскрипционных комплексах, но и усиливать паузы транскрипции в поврежденных участках ДНК. Исследованы механизмы действия белка DksA, который структурно сходен с Gre-факторами, на активность РНК-полимеразы на разных стадиях транскрипции. Полученные данные показывают, что изученные регуляторные факторы могут значительно изменять эффективность транскрипции как нормальной, так и поврежденной ДНК, обеспечивая взаимосвязь процессов транскрипции и репарации.

## **КЛАССИФИКАЦИЯ ПЛАЗМИД, ОБНАРУЖЕННЫХ В «ДРЕВНИХ» ШТАММАХ *ACINETOBACTER LWOFFII* И ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ПЛАЗМИД ШТАММОВ ВСЕГО РОДА *ACINETOBACTER***

**д.б.н. М.А. Петрова**

Сектор анализа и хранения микроорганизмов ЛМГМ ОМГК

На основе анализа структуры белков Rep и Mob проведена классификация 43 плазмид, обнаруженных в пяти «древних» штаммах *Acinetobacter lwoffii*, выделенных из многолетнемерзлых отложений. Показано, что большинство плазмид (25 из 43) составляют мелкие (2-12 т.п.н.) мобилизуемые плазмиды, содержащие ген *mobA*. Обнаружено 6 групп таких плазмид, различающихся по структуре основного района. Гены релаксации плазмид четырех групп отнесены к семейству MOBQ, а двух групп – к семейству P5 (MOBHEN). Среди средних плазмид три мобилизуемые плазмиды отнесены к семейству MOBQ и 2 из 3-х немобилизуемых плазмид - к суперсемейству REP-3. Из восьми крупных плазмид только две являются конъюгативными,

остальные на основании анализа структуры генов репликации распределены в 2 группы (5 и 1).

Обнаружено новое семейство крупных конъюгативных плазмид, отличающихся по структуре основного района от всех исследованных крупных плазмид. Древняя крупная конъюгативная плаزمида pALWED1.1 идентифицирована в качестве плазмиды – прототипа этого семейства.

Показано, что плазмиды, близкородственные «древним» плазмидам, и относящиеся к тем же группам, широко распространены среди современных штаммов ацинетобактеров разных видов, включая клинические штаммы. Этот факт свидетельствует о том, что разработанный нами подход для классификации плазмид *Acinetobacter* может быть использован для разработки классификации плазмид всего рода.

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

1. Agapov A, Esyunina D, Kulbachinskiy A. 2019 Gre-family factors modulate DNA damage sensing by *Deinococcus radiodurans* RNA polymerase. *RNA Biol.* 16(12):1711-1720.
2. Kuzmenko A., Yudin D., Ryazansky S., Kulbachinskiy A., Aravin A.A. 2019. Programmable DNA cleavage by Ago nucleases from mesophilic bacteria *Clostridium butyricum* and *Limnothrix rosea*. *Nucleic Acids Res.* 47(11): 5822-5836.
3. Pupov A., Ignatov A., Agapov A., Kulbachinskiy A. 2019. Distinct effects of DNA lesions on RNA synthesis by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 510(1):122-127.
4. Esyunina D, Pupov D., Kulbachinskiy A. 2019. Interactions in the active site of *Deinococcus radiodurans* RNA polymerase during RNA proofreading. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 509(1): 161-166.
5. Esyunina D, Pupov D., Kulbachinskiy A. Dual role of the  $\sigma$  factor in primer RNA synthesis by bacterial RNA polymerase. 2019. *FEBS Letters.* 593(3):361-368.
6. Шикалов А.Б., Есюнина Д.М., Пупов Д.В., Кульбачинский А.В., Петушков И.В. 2019.  $\sigma$ 24-субъединица РНК-полимеразы *Escherichia coli* способна вызывать паузы транскрипции *in vitro*. *Биохимия*, 84(4): 571-579.

7. Prostova MA, Smertina E, Bakhmutov DV, Gasparyan AA, Khitrina EV, Kolesnikova MS, Shishova AA, Gmyl AP, Agol VI. 2019. Characterization of Mutational Tolerance of a Viral RNA-Protein Interaction. *Viruses*, 11(5). pii: E479.
8. Mindlin S., Beletsky A., Mardanov A., Petrova M. 2019. Adaptive *dif* modules in permafrost strains of *Acinetobacter lwoffii* and their distribution and abundance among present day *Acinetobacter* strains. *Front Microbiol.*, 10: 632.
9. Кудинова А.Г., Соина В.С., Максакова С.А., Петрова М.А. Изучение базовой устойчивости к антибиотикам бактерий, выделенных из различных биотопов. *Микробиология* 2019, том 88, № 6, с. 695–704.

## **ДНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ И БЕЛКИ-АРГОНАВТЫ В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ**

**к.б.н. А.В. Кузьменко**

Лаборатория биологии РНК и эпигенетики

Белки-аргонаваты – древнее семейство белков, которые способны узнавать определенные последовательности нуклеиновых кислот за счет коротких комплементарных «гидовых» молекул РНК или ДНК. Белки-аргонаваты эукариотических организмов играют ключевую роль в процессах РНК-интерференции, узнавая и расщепляя мРНК-мишени, будучи загруженными РНК-гидом. Прокариотические белки-аргонаваты, встречающиеся примерно у 10% представителей данной группы, гораздо более разнообразны по своей структурной организации, и об их функциях и механизме работы известно очень мало. Немногочисленные исследования этих белков показали, что, в отличие от аргонават эукариот, их мишенью зачастую является ДНК. Большинство исследованных имеющих каталитическую активность бактериальных белков Аргонават являются ДНК-гид зависимыми ДНК-нуклеазами и способны расщеплять ДНК *in vitro*. В то же время, природные мишени этих белков и механизмы процессинга нуклеиновых кислот с их участием остаются неизвестны. Мы исследовали механизмы узнавания и процессинга ДНК несколькими бактериальными белками-аргонаватами *in vivo*. Также мы исследовали механизмы функционирования нескольких каталитически неактивных белков-аргонават, которые ассоциированы как с короткими ДНК, так

и с короткими РНК. Для этого мы выделяли белки-аргонавты и ассоциированные с ними нуклеиновые кислоты из «родных» штаммов бактерий, а также после гетерологичной экспрессии в *E.coli*. Картирование отсекуемых коротких ДНК и РНК показало обогащение плазмидными и геномными последовательностями, имеющими чужеродное происхождение. Показано, что узнавание определенных геномных мишеней белками-аргонавтами зависит от процессов репликации и репарации ДНК, а также особенностей экспрессии генов-мишеней. Обнаружено новое явление ДНК-интерференции – процессинг определенных участков геномной ДНК белками-аргонавтами за счет гидовых ДНК плазмидного происхождения. Эксперименты *in vivo*, направленные на выяснение функций данных белков в клетках, показали, что интродукция генов белков-аргонавтов некоторых бактерий в геном *E. coli* и их экспрессия приводит к снижению титров бактериофагов во время инфекции, а также к быстрому сбросу трансформированных плазмид. Таким образом, белки-аргонавты способны подавлять активность чужеродной ДНК в клетках бактерий и регулировать процессы горизонтального переноса генов.

### **Публикации Лаборатории биологии РНК и эпигенетики**

1. Kuzmenko A., Yudin D., Ryazansky S., Kulbachinskiy A., Aravin A.A. 2019. Programmable DNA cleavage by Ago nucleases from mesophilic bacteria *Clostridium butyricum* and *Limnothrix rosea*. *Nucleic Acids Res.* 47: 5822-5836.
2. Kotov A.A., Adashev V.E., Godneeva B.K., Ninova M., Shatskikh A.S., Bazylev S.S., Aravin A.A., Olenina L.V. 2019. piRNA silencing contributes to interspecies hybrid sterility and reproductive isolation in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 47: 4255-4271.
3. Pupov A., Ignatov A., Agapov A., Kulbachinskiy A. 2019. Distinct effects of DNA lesions on RNA synthesis by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 510: 122-127.
4. Mindlin S., Beletsky A., Mardanov A., Petrova M. 2019. Adaptive *dif* modules in permafrost strains of *Acinetobacter lwoffii* and their distribution and abundance among present day *Acinetobacter* strains. *Frontiers in Microbiology.* 10: 632.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА 8-ОХОГ В ЯДЕРНЫХ ЭКСТРАКТАХ КЛЕТОК МЫШИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА “ОБРАМЛЕННОГО ЗЕРКАЛА”

**к.б.н. Л.В. Генинг, К.Ю. Казаченко, А.А. Володин,  
И.В. Макарова, д.б.н. В.З. Тарантул**

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

Главной причиной соматических мутаций, представляющих собой GC-AT трансверсии, является такое повреждение ДНК как 8-оксогуанин (8-охоГ), которое возникает в геноме под воздействием активных форм кислорода, генерирующихся в клетках в процессах окислительного фосфорилирования. Интенсивность превращения этого повреждения ДНК в мутацию является ключевым моментом в возникновении онкологических, неврологических и ряда других заболеваний. Очищенные ДНК-полимеразы *in vitro* с разной интенсивностью встраивают некорректный dA напротив 8-охоГ матрицы. Однако *in vivo* в клетках совокупность белковых факторов, участвующих в репликации ДНК, способна препятствовать этому и приводить к встраиванию корректного dC. Чтобы приблизиться к пониманию реальной ситуации в клетках *in vivo*, мы изучали мутагенный потенциал 8-охоГ в ядерных экстрактах различных органов взрослых мышей и эмбрионов. Для этого был использован модифицированный нами вариант описанного ранее «зеркального» метода, который мы назвали методом "обрамленного зеркала". Полученные нами данные показали, что мутагенный потенциал 8-охоГ существенно варьирует в клетках разных органов взрослых животных. Так, в клетках почек он был равен 8%, тогда как в клетках мозга и семенников он приближался к 20%. Кроме того, у эмбрионов мышей мутагенный потенциал 8-охоГ оказался существенно выше (около 25%), чем в органах взрослых мышей. Этот факт свидетельствует о снижении мутационного действия 8-охоГ в ходе онтогенеза. С помощью метода SSCP показано также, что в ядерных экстрактах клеток мышей 8-охоГ под действием совокупности ДНК-синтезирующих и ДНК-репарирующих белков не возникают другие мутации кроме встраивания dA напротив этого повреждения.

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

**д.б.н. И.А. Гривенников**

Лаборатория молекулярной генетики соматических клеток  
ОВКМГ

В отчетный период 2019 г. были продолжены работы по созданию клеточных моделей болезни Паркинсона (БП) на основе индуцированных плюрипотентных стволовых (ИПСК) от пациентов, страдающих различными формами этого заболевания.

Известно, что развитие нейродегенеративных заболеваний у человека связано не только с нарушениями функционирования нейронов, но и с нарушениями в метаболизме глиальных клеток. Поэтому совершенно очевидно, что для более адекватного моделирования нейродегенеративных процессов *in vitro* необходимо включать в исследования не только нейроны, но и клетки глиального ряда. Было осуществлено сравнение нескольких методик, применяемых для дифференцировки ИПСК в глиальном направлении, по их эффективности. С помощью одного наиболее эффективного метода были получены линии глиальных клеток от здорового донора и двух пациентов с наследственной формой БП (мутации в гене *LRKK2*). Полученные клетки были охарактеризованы не только молекулярно-генетическими методами, но и функциональными - по способности к захвату гамма аминокислоты. С помощью ПЦР в реальном времени было показано, что полученные линии обладали способностью, хотя и с разной эффективностью, экспрессировать ряд известных нейротрофических факторов, таких как GDNF, BDNF, NGF и NT3. Проведены эксперименты по кокультивированию полученных из ИПСК нейронов и глиальных клеток, причем были использованы клетки от здорового донора и от пациентов с БП. Было показано, что кондиционированная среда, полученная при культивировании глиальных клеток от пациента с семейной формой БП, оказывала «угнетающее» действие на рост нейронов здорового донора (уменьшение длины отростков-нейритов и площади тела клетки). Таким образом, можно предположить, что

глиальные клетки также могут вносить вклад в развитие нейродегенеративного процесса при БП.

Исследована экспрессия ключевых генов нейротрофинов и их рецепторов в фибробластах, ИПС клетках и их нейрональных производных (разной стадии зрелости) здоровых доноров и пациентов со спорадической и генетическими формами БП. Показано, что уровни белковых продуктов BDNF и GDNF в нейрональных культурах, полученных от пациентов с наследуемой формой БП, снижены по сравнению с таковыми у здоровых доноров.

В ходе работ 2019 г. был разработан высокочувствительный метод иммунофлуоресцентной детекции, основанный на тирамидной амплификации сигнала (TSA) и «Клик-химии». Данный метод обеспечивает значительное снижение порога детекции анализируемых белковых продуктов *in vitro* и *in vivo*.

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

1. Е.В. Новосадова, Е.Л. Арсеньева, С.А. Антонов, Ю.Н. Ванюшина, Т.В. Малова, А.А. Комиссаров, С.Н. Иллариошкин, Л.Г. Хаспекоев, Л.А. Андреева, Н.Ф. Мясоедов, В.З. Тарантул, И.А. Гривенников. Применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека для оценки нейропротекторной активности фармакологических соединений. Биохимия, 2019, 84, № 11, 1610 – 1621.
2. S.A. Antonov, E.V. Novosadova, A.G. Kobylansky, V.Z. Tarantul, I.A. Grivennikov. A Hybrid Detection Method Based on Peroxidase mediated Signal Amplification and Click Chemistry for Highly Sensitive Background-free Immunofluorescent Staining. J. Histochem. Cytochem., 2019, 58, 1–13.
3. С.А. Антонов, Новосадова Е.В., Кобылянский А.Г., Иллариошкин С.Н., Тарантул В.З., Гривенников И.А. Экспрессия и функциональные свойства NMDA и GABA<sub>A</sub> рецепторов при дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в вентральные мезенцефалические нейроны. Биохимия, 2019, 84, No. 3, 310-320.
4. E.V. Novosadova, Nenasheva V.V., Makarova I.V., Dolotov O.V., Inozemtseva L.S., Arsenyeva E.L., Chernyshenko S.V., Sultanov R.I.,

Illarioshkin S.N., Grivennikov I.A., Tarantul V.Z. Parkinson's disease-associated changes in the expression of neurotrophic factors and their receptors upon neuronal differentiation of human induced pluripotent stem cells. *J. Mol. Neurosci.*, 2019.

5. A.K. Alieva, Rudenok M.M., Novosadova E.V., Vlasov I.N., Arsenyeva E.L., Rosinskaya A.V., Grivennikov I.A., Slominsky P.A., Shadrina M.I. Whole-Transcriptome Analysis of Dermal Fibroblasts, Derived from Three Pairs of Monozygotic Twins, Discordant for Parkinson's Disease. *J. Mol. Neurosci.*, 2019.

## **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ МЕЛАНКОРТИНА НА ТРАНСКРИПТОМ В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО СТРЕССА**

**к.б.н. Л.В. Дергунова, В.В. Ставчанский, И.Б. Филиппенков,  
Н.Ю. Глазова, Е.А. Себенцова, Н.Г. Левицкая,  
акад. Н.Ф. Мясоедов, д.б.н. С.А. Лимборская**

Отдел молекулярных основ генетики человека (ОМОГЧ)  
совместно с ОХФАВ

В современном мире различные формы стрессовых состояний являются важной проблемой для здоровья человека. Стресс определяют как совокупность реакций организма на воздействие различных неблагоприятных факторов. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что хронический и острый стресс оказывают влияние на поведение, способность к обучению и память человека, могут быть причиной развития тревожных расстройств, депрессивных состояний, а также более серьезных заболеваний. Имеются данные, что около 20% населения земли страдают теми или иными расстройствами, являющимися последствиями перенесенного стресса. Становится очевидным, что изучение последствий, вызванных стрессирующими воздействиями на физиологическое и психическое состояние организма, является крайне актуальной проблемой, а вопрос о купировании негативных последствий стресса требует принципиально новых путей решения. В настоящее время при разработке противострессовых препаратов все большее значение придается созданию лекарственных средств на основе естественных регуляторных белков и пептидов. Большие надежды на изучение особенностей действия пептидных препаратов можно возлагать на

исследования с помощью транскриптомных подходов, в том числе основанных на полногеномном секвенировании клеточных РНК.

Наиболее известным пептидным препаратом меланокортинового ряда, успешно зарекомендовавшим себя в клинической практике, является семакс. Применение транскриптомного анализа позволило нам существенно детализировать механизмы действия семакса (АКТГ(4-7)PGP) и синтетического производного меланокортинов пептида АКТГ(6-9)PGP в норме и условиях острого стресса у крыс. Сравнительный анализ содержания мРНК 17368 исследованных генов в гиппокампе крыс, подвергнутых стрессу, получающих семакс, АКТГ(6-9)PGP или физиологический раствор, выявил изменение экспрессия более 900 генов спустя 6 ч после введение каждого из пептидов. Биоинформатический анализ результатов показал, что гены, изменившие экспрессию в гиппокампе стрессированных крыс в ответ на введение семакса, относятся к сигнальным путям, связанным с функционированием рибосом и лизосом, а на введение АКТГ(6-9)PGP – к сигнальным путям, связанным с функционированием рибосом и убиквитин-опосредованного протеолиза. Сравнение уровня транскриптов генов, изменивших экспрессию под воздействием семакса и АКТГ(6-9)PGP в условиях острого стресса, показало, что оба пептида изменяют в одном направлении содержание транскриптов 367 генов, а на экспрессию 20 генов оказывают противоположный эффект. Полученные результаты могут указывать сходство и различие эффектов пептидов меланокортинового ряда в регулировании экспрессии генов в условиях острого стресса.

Таким образом, сравнительный анализ изменения транскриптома в мозге крыс в ответ на введение пептидов АКТГ(6-9)PGP и семакса в норме и условиях стресса позволил выявить возможные мишени воздействия пептидных препаратов, а также сигнальные пути, участвующие в их работе.

### **Публикации Отдела молекулярных основ генетики человека:**

1. Limborska SA, Filippenkov IB. // Circular RNA as a prospective molecular tool for the study of neuroprotection in cerebral ischemia. Transl Cancer Res 2019;8(Suppl 2):S126-S129.

2. Dergunov AD, Savushkin EV, Dergunova LV, Litvinov DY.// Significance of Cholesterol-Binding Motifs in ABCA1, ABCG1, and SR-B1 Structure. // J Membr Biol. //2019 Feb; 252(1):41-60.
3. Huckins LM, Dobbyn A, Ruderfer DM, Hoffman G, ... Khrunin A, Limborska S, Slominsky P ... Devlin B, Sieberts SK, Cox NJ, Im HK, Sklar P, Stahl EA. Gene expression imputation across multiple brain regions provides insights into schizophrenia risk. Nat Genet. 2019;51(4):659-674.
4. Harold D, Connolly S, Riley BP, Kendler KS, ... Khrunin A, Limborska S, Slominsky P ... Donohoe G, Gill M, Corvin A, Morris DW. Population-based identity-by-descent mapping combined with exome sequencing to detect rare risk variants for schizophrenia. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2019; 180(3):223-231.
5. Hess JL, Tylee DS, Mattheisen M, ... Khrunin A, Limborska S, Slominsky P ... Edenberg HJ, Holmans P, Faraone SV, Glatt SJ. A polygenic resilience score moderates the genetic risk for schizophrenia. Mol Psychiatry. 2019 Sep 6. [Epub ahead of print].
6. Zhernakova DV, Brukhin V, Malov S, Oleksyk TK, Koepfli KP, Zhuk A, Dobrynin P, Kliver S, Cherkasov N, Tamazian G, Rotkevich M, Krasheninnikova K, Evsyukov I, Sidorov S, Gorbunova A, Chernyaeva E, Shevchenko A, Kolchanova S, Komissarov A, Simonov S, Antonik A, Logachev A, Polev DE, Pavlova OA, Glotov AS, Ulantsev V, Noskova E, Davydova TK, Sivtseva TM, Limborska S, Balanovsky O, Osakovsky V, Novozhilov A, Puzyrev V, O'Brien SJ. Genome-wide sequence analyses of ethnic populations across Russia. Genomics. 2019 Mar 19. pii: S0888-7543(18)30741-9.

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

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

Сегодня одним из наиболее динамичных направлений в нейробиологии глутамат-рецепторной системы является поиск и создание позитивных аллостерических модуляторов (ПАМ) NMDA и AMPA рецепторов. Препараты на основе ПАМ рассматривают в качестве перспективных кандидатов для лечения широкого спектра неврологических заболеваний. Химическая структура ПАМ-43 близка к структуре иных уже известных ПАМ AMPA рецепторов. Проведены исследования нового производного диазабициклононана (ПАМ-43) – потенциального позитивного аллостерического модулятора AMPA рецепторов. В частности, охарактеризованы места специфических взаимодействий данного лиганда на плазматических мембранах клеток головного мозга крысы, а также показана способность ПАМ-43 потенцировать ионные токи AMPA рецепторов. С использованием метода “Patch-clamp” показано, что ПАМ-43 концентрационно-зависимо увеличивает токи AMPA рецепторов в нейронах различных отделов головного мозга крысы. Результаты исследования позволят разработать методику скрининга пептидных соединений. В качестве основного лиганда предполагается использовать [3H]ПАМ-43. Работа выполнена совместно с Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институтом физиологически активных веществ Российской академии наук.

На основе многолетних исследований выявлена группа пептидов глипролинового ряда, оказывающая нормализующее действие на состояние гемостаза в динамике. Изучено регуляторное влияние пептидов глипролинового ряда, включающих такие аминокислоты, как аргинин и лизин – Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro (KKRRPGP), Arg-Lys-Lys-Arg-Pro-Gly-Pro (RKKRPGP) и Lys-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro (KRKPGP) на состояние первичного и плазменного гемостаза в динамике. Установлено, что через 20 ч после последнего введения пептидов параметры первичного (агрегации тромбоцитов) и плазменного гемостаза (активированного частичного тромбопластинового времени – АЧТВ, уровня фактора XIIIa, фибриногена, фибриндеполимеризационной активности – ФДПА) свидетельствовали о восстановлении функционального состояния свертывающей и противосвертывающей систем организма. Подобные изменения сохранялись и через 7 суток после отмены введения

препаратов. Высказывается предположение о перспективности изучения указанной группы пептидов в условиях патологически повышенной свертываемости крови с последующим их внедрением в клиническую практику.

При проведении исследований показано, что синтезированные соединения формулы X-β-Ala-L-His, где X салициловая или ацетилсалициловая кислота обладают высокой антиагрегантной, супероксид-перехватывающей, антиоксидантной и цитопротекторной активностью по сравнению с карнозином формулы β-Ala-L-His и способны обеспечивать защиту слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта от побочных повреждающих эффектов, присущих нестероидным противовоспалительным препаратам. Пептид Gly-His-Lys (GHK) обладает достаточно широким спектром биологической активности и оказывает влияние на процессы регенерации ткани, антиоксидантные, иммуностропные, противовоспалительные, анальгетические и нейротропные эффекты. Учитывая перспективность этого пептида, разработаны схемы синтеза, синтезированы и охарактеризованы новые пептиды аналоги GHK, а именно Gly-His-Lys-Gly-Pro (GHKGP) и Gly-His-Lys-Pro-Gly-Pro (GHKPGP). Показано анксиолитическое действие пептида Gly-His-Lys-Gly-Pro (GHKGP), которое оценивалось при помощи методик, основанных на ненаказуемом (методика приподнятого крестообразного лабиринта) и наказуемом (тест конфликтной ситуации по Vogel) поведении. Проведены исследования анальгетического эффекта пептида Gly-His-Lys-Pro-Gly-Pro (GHK-PGP) при боли вызванной температурным раздражением. В результате проведенного исследования показано, что пептид Gly-His-Lys-Pro-Gly-Pro (GHK-PGP) обладает достоверно выраженным анальгетическим эффектом в дозах 0,5, 5,0 и 50,0 мкг/кг массы тела при боли, вызванной температурным раздражением по сравнению с контролем.

Проведено исследование простых глипролинов в качестве транспортеров физиологически активных веществ (серотонин, дофамин, доксирубицин) через гематоэнцефалический барьер. Синтезированы Вос-Pro-Dox, Вос-Pro-DOPA, Вос-Pro-Srt конденсацией Вос-Pro с DOPA, Srt и Dox. Изучен процесс введения дейтерия и трития в производные DOPA, Srt и Dox, которые малорастворимы в апротонных растворителях. Используя данные, полученные в экспериментах *in vitro*, проведена оценка стабильности Вос-Pro-DOPA, Вос-Pro-Srt в биологических средах как в присутствии пролиновой

эндопептидазы (PER), лейцинаминопептидазы, дипептидной пептидазы, карбоксипептидазы В и Y, так и при использовании плазмы крови крыс. Показана высокая устойчивость пролиновых производных DOPA и Srt к действию перечисленных выше протеаз.

Разработан масс-спектрометрический метод определения содержания производных дофамина и серотонина в зависимости от строения их пептидного фрагмента, позволяющий оценить эффективность их проникновения через искусственные мембраны. В результате проведенных исследований было показано, какие соединения из исследованных соединений легче проникали через искусственные мембраны.

Исследована цитотоксичность модифицированных физиологически активных соединений с использованием линий клеток U-87MG, A549, BJ-5ta и SH-SY5Y.

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.

## **ИЗУЧЕНИЕ ПОСЛЕДСТВИЙ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ НА МОДЕЛИ НЕДОНОШЕННОЙ И ДОНОШЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ**

**к.б.н. Е. А. Себенцова.**

Лаборатория молекулярных основ регуляции поведения ОХФАВ

Перинатальная гипоксия (ПГ) является наиболее распространенной причиной смерти новорожденных, а также может приводить в дальнейшем к развитию функциональных расстройств и нарушений поведения. ПГ встречается у 1-3 на 1000 доношенных новорожденных и в 60% случаев у недоношенных новорожденных. Высокая частота встречаемости и тяжелые последствия для ребенка определяют важность и актуальность проблемы исследования последствий ПГ. В связи с этим возникает вопрос о разработке

адекватных моделей ПГ для дальнейшего изучения ее патогенеза и поиска путей коррекции последствий гипоксии [Gaudet et al., 2016].

Согласно клиническим данным, перинатальные воздействия, перенесенные на разных сроках развития, по-разному отражаются на формировании ЦНС ребенка. В представленной работе нами использовались модифицированные модели гипоксического повреждения мозга грызунов на разных сроках развития ЦНС – на 2 или 10 постнатальные дни (ПНД). Указанные модели рассматривались нами в качестве моделей ПГ у недоношенных и доношенных новорожденных, соответственно. Для моделирования ПГ грызуны соответствующего возраста на 2 часа помещались в камеру, содержащую 8% кислорода.

При исследовании эффектов однократной нормобарической гипоксии у детенышей белых крыс как в возрасте 2 (ОНГ-2), так и 10 дней (ОНГ-10) нами была зарегистрирована значительная неонатальная смертность. При ОНГ-10 уровень летальности был значимо выше. Кроме того, уровень летальности при ОНГ-10 у самцов был выше, чем у самок. У выживших животных после ОНГ-2 и ОНГ-10 наблюдался выраженный цианоз, о чем свидетельствует синюшная окраска кожи. У животных, перенесших гипоксию, наблюдается в дальнейшем отставание по массе тела, при этом характер изменений прироста веса тела определялся возрастом гипоксического воздействия. ОНГ-2 приводила к долговременному отставленному отставанию по массе тела, в случае воздействия ОНГ-10 наблюдалось замедление набора веса только в течение 5 дней после сеанса гипоксии.

Показателем физического развития потомства также является скорость созревания сенсорно-моторных рефлексов в период вскармливания. ОНГ-2 привела к увеличению времени выполнения рефлексов «переворот на плоскости» на 6 ПНД и «отрицательный геотаксис» на 12 ПНД. В модели ОНГ-10 в тесте «отрицательный геотаксис» крысам, перенесшим гипоксию, требовалось больше времени на то, чтобы достичь края платформы, что говорит о нарушении созревания рефлекса.

Методом ПЦР в реальном времени было зарегистрировано увеличение уровня экспрессии генов HIF1- $\alpha$ , GRP $\alpha$ 4 и BDNF сразу после завершения сеанса гипоксии в целом мозге крыс, подвергавшихся гипоксии на 2 ПНД, и в гиппокампе крыс в модели ОНГ-10.

Согласно клиническим данным, уровень летальности у доношенных новорожденных, перенесших ПГ, выше, чем у недоношенных (Cohen, Stonestreet, 2014). У новорожденных, перенесших асфиксию, отмечается нарушение становления неонатальных рефлексов [Ten et al., 2003]. В клинике зарегистрировано увеличение активности GRx и уровня BDNF в цереброспинальной жидкости и крови новорожденных, перенесших гипоксию [Vasiljevic et al., 2012; Korhonen et al., 1998; Imam et al., 2009]. Таким образом, зарегистрированные нами острые эффекты гипоксического воздействия у крыс в возрасте 2 и 10 дней сопоставимы с результатами, полученными в клинических исследованиях на новорожденных детях, перенесших гипоксию, что свидетельствуют об адекватности выбранных нами моделей.

## **КАТИОННЫЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С S-ДОНОРНЫМИ ЛИГАНДАМИ - НОВАЯ ГРУППА ИНГИБИТОРОВ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗЫ-1**

**к.б.н. С.И. Шрам**

Сектор нейрофармакологии ОХФАВ

Система поли(АДФ-рибозил)ирования белков вовлечена в патогенез целого ряда тяжелых заболеваний, таких как инфаркт миокарда, инфаркт головного мозга, эндотоксический шок, сахарный диабет, ревматоидный артрит. Это связано с чрезмерной активацией поли(АДФ-рибоза)-полимеразы-1 (ПАРП-1) в условиях патологии, результатом чего является снижение в клетке уровней НАД<sup>+</sup> и АТФ, перераспределение и изменение активности множества регуляторных белков и ферментов, разбалансировка внутриклеточных сигнальных путей, активация провоспалительных транскрипционных факторов, и, наконец, нарушение функционирования и снижение жизнеспособности клетки. В этой связи применение в качестве лекарственных средств ингибиторов ПАРП-1 может быть весьма эффективным подходом в лечении перечисленных выше патологий. Несомненно также, что сведения о влиянии лекарственных средств различных фармакологических групп на процессы поли(АДФ-рибозил)ирования белков будут в значительной степени способствовать их более рациональному применению.

Нами была исследована способность ряда оригинальных доноров NO, представляющих собой водорастворимые катионные динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиокарбамидом и его производными, модулировать активность ПАРП-1. Комплексы были синтезированы и охарактеризованы сотрудниками Института прикладной химической физики РАН (г. Черноголовка, Московская обл.). Некоторые важные характеристики этих комплексов, включая их кристаллическую структуру, NO-донорные свойства, стабильность, токсичность и влияние на метаболические процессы в клетке были описаны ранее. С использованием рекомбинантной ПАРП-1 человека (рПАРП-1) нами были установлены дозовые зависимости ингибиторного действия 6 катионных ДНКЖ различной структуры. Было показано, что все исследуемые комплексы характеризовались близкими значениями IC50, и при высоких концентрациях вызывали практически полное подавление каталитической активности рПАРП-1. Обнаружено, что катионные ДНКЖ сохраняли высокий ингибиторный потенциал и после их длительной инкубации в нейтральном буферном растворе в условиях, приводящих к практически полному высвобождению всего лабильного пула NO, удерживаемого ДНКЖ. Анализ полученных данных показывает, что ПАРП-1-ингибиторная активность исследуемых комплексов существенно не зависит от структуры S-донорного лиганда, и, видимо, обуславливается собственно наличием четырехкоординатного динитрозильного комплекса железа. Также продемонстрирована способность катионных ДНКЖ ингибировать активность ПАРП в культуре клеток.

Таким образом, в данном исследовании было установлено, что синтетические катионные ДНКЖ с тиокарбамидом и его производными являются мощными ингибиторами ПАРП-1 человека. Поскольку по своей структуре они принципиально отличаются от описанных ранее ингибиторов ПАРП-1, их можно рассматривать в качестве родоначальников нового оригинального семейства ингибиторов ПАРП-1.

**Публикации Отдела химии физиологически активных веществ (зарубежные):**

1. Vyunova T.V., Andreeva L.A., Shevchenko K.V., Myasoedov N.F. An integrated approach to study the molecular aspects of regulatory peptides biological mechanism//2019, Journal of Labelled Compounds and

Radiopharmaceuticals, Jul 20. Volume 62, Issue12, Pages 812-822, October 2019, <http://www.interscience.wiley.com/jpages/0362-4803>.

2. Sukhanova I. A., Sebentsova E. A., Khukhareva D. D., Vysokikh M. Y., Bezuglov V. V., Bobrov M. Y., Levitskaya N. G. Early-life N-arachidonoyl-dopamine exposure increases antioxidant capacity of the brain tissues and reduces functional deficits after neonatal hypoxia in rats // 2019, International Journal of Developmental Neuroscience, v. 78, p. 7-18.

3. Akentieva N.P., Sanina N.A., Gizatullin A.R., Shkondina N.I., Prikhodchenko T.R., Shram S.I., Zhelev N., Aldoshin S.M. Cytoprotective Effects of Dinitrosyl Iron Complexes on Viability of Human Fibroblasts and Cardiomyocytes//2019, Front Pharmacol, Nov 11; 10:1277, 1-21, eCollection 2019.

4. Samotrueva M., Yasenyavskaya A., Myasoedov N., Andreeva L. Representatives of neuropeptides – Selank and Pro-Gly-Pro-Leu as modulators of immunoreactivity in conditions of “social” stress//2019, Journal Archiv EuroMEDICA, vol.9, num. 2, p.86-89, <http://ewg-board.eu/archiv-euromedica/index.html>, ISSN 2193-3863.

5. Yasenyavskaya A., Samotrueva M., Murtalieva V., Myasoedov N., Andreeva L. Influence of Semax on the intensity of redox reactions in immunocompetent organs in the conditions of “social” stress //2019, Journal Archiv EuroMEDICA, vol.9, num. 2, p.90-93, <http://ewg-board.eu/archiv-euromedica/index.html>, ISSN 2193-3863.

6. Samotrueva M., Yasenyavskaya A., Tsibisova A., Bashkina O., Myasoedov N., Andreeva L. The influence of Pro-Gly-Pro-Leu on the level of cytokines under the conditions of “Social” stress//2019, Journal Archiv EuroMEDICA, vol.9, num. 3, p.29-32, <http://ewg-board.eu/archiv-euromedica/index.html>, ISSN 2193-3863, ISSN print: 2193-3863; ISSN-Internet: 2199-885X.

7. Yasenyavskaya A., Samotrueva M., Serdalieva M., Myasoedov N., Andreeva L. Influence of Selank, Pro-Gly-Pro and Pro-Gly-Pro-Leu on the intensity of redox reactions in immunocompetent organs under conditions of “Social” stress//2019, Journal Archiv EuroMEDICA, vol.9, num. 3, p.25-28, <http://ewg-board.eu/archiv-euromedica/index.html>, ISSN print: 2193-3863;ISSN-Internet: 2199-885X.

В российских журналах - 31 статья

В иностранных журналах – 7 статей

Получено патентов российских – 8

## **БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМАМИ**

**д.б.н. И.А. Хмель, В.А. Плюта, О.А. Кокшарова**

Лаборатория регуляции экспрессии генов микроорганизмов

Основная тематика исследований Лаборатории в 2019 г. была посвящена изучению биологической активности и механизмов действия летучих органических соединений (ЛОС), образуемых микроорганизмами. В последние годы способность микроорганизмов синтезировать летучие соединения и изучение их функциональной роли привлекает активное внимание исследователей различного профиля, работающих как в фундаментальных, так и в прикладных областях биологии.

Известно, что бактерии и грибы синтезируют огромное количество ЛОС различной химической природы. Одна бактерия может синтезировать до 100 различных ЛОС. Опубликована база данных ЛОС, образуемых бактериями и микроскопическими грибами, включающая больше 2000 идентифицированных ЛОС, что не исчерпывает, конечно, всех природных ЛОС. Феномен синтеза ЛОС микроорганизмами вызывает огромный интерес исследователей как новый, мало изученный аспект конкурентных отношений микроорганизмов и их взаимодействия с высшими организмами. Показано, что ЛОС могут подавлять или стимулировать рост микроорганизмов, растений и других организмов. 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 мало.

В 2019 г. нами были получены следующие основные результаты, связанные с изучением биологической активности

индивидуальных ЛОС с различными химическими структурами, выделяемых бактериями разных таксономических групп (кетонов, спиртов, терпенов).

1. Ранее мы показали, что ЛОС могут подавлять рост бактерий, в том числе, фитопатогенных агробактерий, образующих опухоли (корончатые галлы) у растений; эти бактерии наносят серьезный ущерб растениеводству. Важной характеристикой действия ЛОС является их влияние на формирование биопленок бактерий. Способность бактерий, особенно патогенных и фитопатогенных, образовывать биопленки, борьба с биопленами является серьезнейшей проблемой в медицине, растениеводстве, биотехнологии, т.к. бактерии, обитающие в биопленках, значительно более резистентны к действию антибактериальных агентов. Поэтому образование биопленок способствует распространению инфекций и является причиной многих трудно излечиваемых хронических заболеваний. Большое количество лабораторий и компаний в различных странах мира занимаются разработкой методов борьбы с биопленками патогенных бактерий, однако, эта задача еще не решена. В связи с этим, представляло интерес исследовать действие ЛОС на биопленки бактерий.

В 2018 г. нами были получены первые данные, показавшие ингибирование образования биопленок при действии 2-октанона, изоамилового спирта и бета-ионона. В 2019 г. действие этих ЛОС было более подробно изучено, исследовалось также действие 2-фенилэтанола, кетонов 2-бутанона и 2-пентанона, терпенов лимонена и альфа-пинена. Сравнение действия на биопленки изученных ЛОС с различными структурами, проведенное впервые, показало, что наибольшее ингибирующее действие на биопленки оказывали 2-октанон, изоамиловый спирт и 2-фенилэтанол. Слабее действовали  $\beta$ -ионон, 2-пентанон и практически не действовали лимонен, 2-бутанон и альфа-пинен. На выживаемость клеток в составе зрелых биопленок ЛОС влияли слабее, чем на образование биопленок.

2. Впервые были получены данные о действии указанных индивидуальных бактериальных ЛОС на миграцию (motility) бактерий *A. tumefaciens*. Это свойство бактерий важно для их распространения и образования биопленок. Показано, что ЛОС бактерий подавляют свимминг-миграцию (swimming) агробактерий. Наибольшее ингибирующее действие оказывали изоамиловый спирт, 2-фенилэтанол, 2-октанон, 2-пентанон, 2-бутанон; практически не

действовали  $\beta$ -ионон,  $\beta$ -пинен, лимонен. С увеличением количества ЛОС подавляющее действие ЛОС на свимминг-миграцию возрастало. Например, наблюдалось уменьшение радиуса свимминг-миграции при дозах 2-пентанона от 50 до 200 мкмоль; при 200-300 мкмоль свимминг-миграция не обнаруживалась. Было показано, что клетки *A. tumefaciens* не обладали двумя другими типами миграции – сворминг (swarming) и твитчинг (twitching) миграцией.

3. Действие ЛОС на Quorum Sensing (QS) регуляцию было исследовано с использованием специфических биосенсоров на N-ацил-гомосеринлактоны (сигнальные молекулы QS систем регуляции). Сенсорами были клетки *Escherichia coli* с плазмидами, содержащими гены регуляторных рецепторных белков (*luxR Vibrio fischeri*, *lasR* и *rhlR Pseudomonas aeruginosa*) и репортер *lux*-оперон. По уровню люминесценции судили об эффективности экспрессии генов АГЛ-синтаз. Впервые показано, что ЛОС 2-октанон и 2-фенилэтанол существенно снижают QS-ответ – эти соединения подавляли экспрессию *lux*-репортерного оперона (в среднем, в 5 – 10 раз при 10 мкмоль 2-октанона и 50 мкмоль 2-фенилэтанола, соответственно).

4. Исследовано действие указанных индивидуальных ЛОС на рост растений *Arabidopsis thaliana*. Показано, что сильнее всего подавляли рост растений изоамиловый спирт, кетон 2-октанон, 2-фенилэтанол (начиная с 30 – 50 мкмоль на чашку Петри). Лимонен и  $\beta$ -ионон ингибировали рост растений в более высоких количествах (200 – 600 мкмоль).  $\beta$ -пинен не оказывал влияния на рост растений. Интересно, что кетоны 2-бутанон и 2-пентанон стимулировали рост *A. thaliana* при использовании их в количестве 200 – 400 мкмоль на чашку Петри. Механизм этого эффекта пока непонятен.

5. Было исследовано действие ЛОС бактериального происхождения на развитие и выживаемость плодовых мушек *Drosophila melanogaster* (совместно с сотрудниками лаб. ОМГК). Мы показали, что в присутствии лимонена и  $\alpha$ -пинена *D. melanogaster* погибали быстрее всего. Чуть более слабое действие оказывали кетоны 2-октанон, 2-пентанон и 2-бутанон.  $\beta$ -ионон также вызывал гибель мушек, однако, это ЛОС оказывало замедленное действие. Изоамиловый спирт и 2-фенилэтанол действовали слабее всего из всех представленных соединений.

Полученные результаты показали, что действие одних и тех же ЛОС может различаться в отношении организмов - представителей разных царств.

6. Установлена роль SprI/SprR QS системы *Serratia proteamaculans* в синтезе летучих соединений, подавляющих рост мицелия фитопатогенных грибов. С использованием сконструированного нами мутанта с инактивированным геном *sprI*, лишённого синтеза N-ацил-гомосеринлактонов, мы показали, что нокаут этого гена приводит к уменьшению подавления роста мицелия *Rhizoctonia solani* и *Helminthosporium sativum* летучими соединениями, выделяемыми *S.proteamaculans*. Показана комплементация мутации введением в клетки бактерии QS генов близко родственной бактерии *S.plymuthica*; при этом восстанавливались и другие функции, нарушаемые инактивацией гена *sprI*.

Таким образом, получены новые 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. Zaitseva Y. V., Koksharova O.A., Valentina A. Lipasova V.A., Plyuta V.A., Demidyuk I.V., Leonid S. Chernin L.S., Khmel I.A. SprI/SprR Quorum Sensing System of *Serratia proteamaculans* 94. BioMed Research International Volume 2019, Article ID 3865780, 10 pages.
2. Zaitseva Y.V., Lipasova V.A., Plyuta V.A., Koksharova O.A, Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Khmel I.A. Effect of inactivation of *luxS* gene on the properties of *Serratia proteamaculans* 94 strain. Folia Microbiol (Praha). 2019; 64(3):265-272.
3. Radzig M. A., Koksharova O. A., I. A. Khmel, V. K. Ivanov, K. E. Yorov, Kiwi J., Rtimi S., Tastekova , Aybush A., . Nadtochenko V. A.. Au/TiO<sub>2</sub> plasmon photocatalysis: femtosecond spectroscopy of the hot electron injection into TiO<sub>2</sub>, bacterial inactivation, bactericide Au-ions and related phenomena. Nanomaterials (Basel). 2019, 9(2). pii: E217.

4. Voronova E.N., Konyukhov I.V., Koksharova O.A., Popova A.A., Pogosyan S.I., Khmel I.A., Rubin A.B. Inhibition of cyanobacterial photosynthetic activity by natural ketones. *J Phycol.* 2019, 55: 840-857.
5. Rtimi S., Nadochenko V., Khmel I., Konstantinidis S., Britun N., Kiwi J. Monitoring the energy of the metal ion-content plasma-assisted deposition and its implication for bacterial inactivation. *Applied Surface Science*, 2019, 467–468:749-752.
6. Веселова М.А., Плюта В.А., Хмель И.А. Летучие вещества бактерий: структура, биосинтез, биологическая активность. *Микробиология*, 2019, 88:272-287.
7. Зайцева Ю.В., Сидоров А.В., Маракаев О.А., Хмель И.А. Растительно-микробные взаимодействия с участием Quorum sensing регуляции. *Микробиология*, 2019, 88:519-531.

## **ПОПЫТКИ ПОЛУЧЕНИЯ СТРУКТУРЫ ДНК-ПРАЙМАЗЫ И ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА PRIMPOL**

**Д.И. Гагаринская, Е.О. Болдинова, Е.С. Шилкин, Анна В. Макарова, Я.Г. Калюжная, А.А. Манукян, к.б.н. Алена В. Макарова**

**Лаборатория механизмов репликации поврежденной ДНК**

PrimPol – самая последняя открытая и наименее изученная ДНК-полимераза человека. По свойствам PrimPol сильно отличается от других ДНК-полимераз и праймазы человека. Не ясны механизмы переключения/регуляции активности PrimPol. Структура PrimPol с доменом цинкового пальца, необходимого для праймазной активности PrimPol, не известна.

В 2019 году мы начали исследования, направленные на расшифровку рентгеновской структуры PrimPol и провели анализ роли отдельных структурных элементов в связывании ДНК, ДНК-полимеразной и ДНК-праймазной активностях. Исследования были проведены в сотрудничестве с лабораторией проф. Т. Тагирова (Омаха, США). Были получены 24 варианта PrimPol с делециями в разных районах PrimPol, затрагивающие N-концевой и C-концевой участки, неструктурированный район каталитического кора и подвижный линкер между каталитическим доменом и доменом цинкового пальца. Показана важная роль N-концевого района в

связывании ДНК. Подобраны условия для кристаллизации и образования стабильного комплекса PrimPol с ДНК и входящими нуклеотидами, показана роль сиквенс-контекста в стабилизации комплекса PrimPol-ДНК.

**Публикации Лаборатории механизмов репликации поврежденной ДНК:**

1. Yudkina A.V., Shilkin E.S., Endutkin A.V., Makarova A.V., Zharkov D.O. Reading and misreading 8-oxoguanine, a paradigmatic ambiguous nucleobase // *Crystals*, 2019, 9(5): 269.
2. Kim D.V., Makarova A.V., Miftakhova R.R. Zharkov D.O. Base excision DNA repair deficient cells: from disease models to genotoxicity sensors // *Curr Pharm Design*, 2019, 25(3), 298 — 312.
3. Boldinova E.O., Khairullin R.K., Makarova A.V., Zharkov D.O. Isoforms of base excision repair enzymes produced by alternative splicing // *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20(13). pii: E3279.

**ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ФАКТОРЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЫБОРА СПЕЙСЕРОВ В ХОДЕ CRISPR АДАПТАЦИИ**

**О.С. Мушарова, Д.Р. Выговский, К.В. Северинов**

Лаборатория регуляции экспрессии генов мобильных элементов прокариот

CRISPR-Cas-системы адаптивного иммунитета прокариот состоят из CRISPR-кассет (участков генома с идентичными повторами и разделяющими их уникальными спейсерами) и генов *cas*. CRISPR-кассеты и гены *cas* вместе способны обеспечивать устойчивость клеток к бактериофагам и плазмидам, которые содержат протоспейсеры - последовательности, комплементарные спейсерам CRISPR-кассеты. Механизм действия CRISPR-Cas систем условно можно разбить на два модуля: CRISPR-адаптации (изменение генома клетки за счет встраивания новых спейсеров в кассету) [1] и CRISPR-интерференции (высокоспецифичное узнавание протоспейсеров мишени и внесения в них разрывов) [2]. Вопрос об участии не-CRISPR систем клетки в процессах адаптации и интерференции и их регуляции лишь начинает

изучаться. К настоящему моменту показано влияние хеликазы RecG, белка PriA, ДНК полимеразы I и RecB на процесс CRISPR адаптации [3].

В данной работе мы исследовали влияние компонентов репарационной машины на процесс CRISPR адаптации в *Escherichia coli*. Для этого мы проводили биоинформатический анализ вновь приобретенного спейсерного разнообразия удлинённых CRISPR кассет в штаммах *E. coli*, несущих делеции в генах RecBCD комплекса. Данная работа выполнена при поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2019) О.С.М.

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

1. Virus-borne mini-CRISPR arrays are involved in interviral conflicts. Medvedeva S, Liu Y, Koonin EV, Severinov K, Prangishvili D, Krupovic M. Nat Commun. 2019 Nov 15;10(1):5204.
2. Genome Maintenance Proteins Modulate Autoimmunity Mediated Primed Adaptation by the Escherichia coli Type I-E CRISPR-Cas System. Kurilovich E, Shiriaeva A, Metlitskaya A, Morozova N, Ivancic-Bace I, Severinov K, Savitskaya E. Genes (Basel). 2019 Oct 31;10(11). pii: E872.
3. Detection of spacer precursors formed in vivo during primed CRISPR adaptation. Shiriaeva AA, Savitskaya E, Datsenko KA, Vvedenskaya IO, Fedorova I, Morozova N, Metlitskaya A, Sabantsev A, Nickels BE, Severinov K, Semenova E. Nat Commun. 2019 Oct 10;10(1):4603.
4. Systematic prediction of functionally linked genes in bacterial and archaeal genomes. Shmakov SA, Faure G, Makarova KS, Wolf YI, Severinov KV, Koonin EV. Nat Protoc. 2019 Oct;14(10):3013-3031.
5. Reiterative Synthesis by the Ribosome and Recognition of the N-Terminal Formyl Group by Biosynthetic Machinery Contribute to Evolutionary Conservation of the Length of Antibiotic Microcin C Peptide Precursor. Zukher I, Pavlov M, Tsibulskaya D, Kulikovskiy A, Zyubko T, Bikmetov D, Serebryakova M, Nair SK, Ehrenberg M, Dubiley S, Severinov K. MBio. 2019 Apr 30;10(2). pii: e00768-19.
6. Natural diversity of CRISPR spacers of Thermus: evidence of local spacer acquisition and global spacer exchange. Lopatina A, Medvedeva S, Artamonova D, Kolesnik M, Sitnik V, Ispolatov Y, Severinov K. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2019 May 13;374(1772):20180092.
7. Systematic analysis of Type I-E Escherichia coli CRISPR-Cas PAM sequences ability to promote interference and primed adaptation.

Musharova O, Sitnik V, Vlot M, Savitskaya E, Datsenko KA, Krivoy A, Fedorov I, Semenova E, Brouns SJ, Severinov K. Mol Microbiol. 2019 Jun;111(6):1558-1570.

8. Cryo-EM structure and in vitro DNA packaging of a thermophilic virus with supersized T=7 capsids. Bayfield OW, Klimuk E, Winkler DC, Hesketh EL, Chechik M, Cheng N, Dykeman EC, Minakhin L, Ranson NA, Severinov K, Steven AC, Antson AA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Feb 26;116(9):3556-3561.

9. Structure Studies of the CRISPR-Csm Complex Reveal Mechanism of Co-transcriptional Interference. You L, Ma J, Wang J, Artamonova D, Wang M, Liu L, Xiang H, Severinov K, Zhang X, Wang Y. Cell. 2019 Jan 10;176(1-2):239-253.e16.

## **ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ И РНК ПРОФИЛИРОВАНИЕ В ИЗУЧЕНИИ ПАТОГЕНЕЗА МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ И МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

**д.б.н. П.А. Сломинский**

Лаборатория молекулярных основ наследственных  
болезней

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. Считается, что важную роль в патогенезе БП могут играть изменения, связанные с эпигенетической регуляцией экспрессии генов. Для исследования таких изменений наиболее оптимальным является изучение людей, обладающих практически одинаковым генетическим бэкграундом. К таким лицам относятся, в первую очередь, монозиготные близнецы. В данной работе было проведено РНК секвенирование дермальных фибробластов, полученных сразу от трех пар монозиготных близнецов, дискордантных по БП. Биоинформатическая обработка данных секвенирования проводилась отдельно для каждой пары близнецов и после этого отбирались только те гены, которые дифференциально экспрессируются во всех трех парах, и изменение экспрессии происходит в одном направлении. В результате анализа было

выявлено 29 дифференциально экспрессирующихся генов или ДЭГ. Для этих генов был проведен анализ обогащения (Enrichment analysis), при котором во внимание принимались метаболические процессы с  $p.\text{val} < 0.05$  (с поправкой Бонферрони) и все виды связей. При этом было выявлено 7 метаболических процессов, 2 из которых непосредственно связаны с функционированием нервной системы (GO:0019228: «neuronal action potential»; GO:0051966: «regulation of synaptic transmission, glutamatergic»). В ходе проведения Enrichment analysis была построена сеть отобранных метаболических процессов и было показано, что выявленные процессы делятся на два больших кластера, не связанных друг с другом. В первый кластер входит процесс «positive regulation of fat cell differentiation», обладающий наибольшей статистической значимостью. При этом необходимо отметить, что гены, входящие в данный процесс, связаны не только с дифференцировкой жировых клеток, но также с другими процессами, в том числе и с нейрональными. Дальнейший анализ с использованием функциональных сетей взаимодействий показал, что наиболее значимыми генами, занимающими центральное положение в этом кластере, являются гены *PTGS2*, *SCN9A* и *GRIK2*. Эти гены можно рассматривать как потенциальные гены-кандидаты БП.

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. 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 секвенирование около 4800 генов и областей генома, для которых показана связь с развитием различных заболеваний. Такое целевое секвенирование ДНК пациентов с ГКМП позволило выявить как спектр патогенетически значимых мутаций в основных генах ГКМП (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *MYL2*, *MYL3*, *TPM1*, *ACTC2*, *TNNI3*), так и ряд новых вариантов с предполагаемой патогенетической значимостью, характерных для пациентов с ГКМП из России. В частности были выявлены мутации с доказанной патогенетической значимостью Q1233\* и Y847\* в гене *MYBPC3* и G741R в гене *MYH7*, а также ряд потенциально патогенетически значимых мутаций V698M, R1045L, R143W, H1778L в гене *MYH7*, Q247\* в гене *TRIM63*, R796C в гене *ACTN2*

и некоторые другие. Общая частота выявленных патогенетически значимых мутаций российской популяции составила 20%, что в два раза ниже, чем в среднем в мире.

**Публикации Лаборатории молекулярных основ наследственных болезней:**

1. Alieva AK, Rudenok MM, Novosadova EV, Vlasov IN, Arsenyeva EL, Rosinskaya AV, Grivennikov IA, Slominsky PA, Shadrina MI. Whole-Transcriptome Analysis of Dermal Fibroblasts, Derived from Three Pairs of Monozygotic Twins, Discordant for Parkinson's Disease. J Mol Neurosci. 2019 Dec 10.
2. Huckins LM, Dobbyn A, Ruderfer DM, Hoffman G, ... Khrunin A, Limborska S, Slominsky P ... Devlin B, Sieberts SK, Cox NJ, Im HK, Sklar P, Stahl EA. Gene expression imputation across multiple brain regions provides insights into schizophrenia risk. Nat Genet. 2019; 51(4):659-674.
3. Harold D, Connolly S, Riley BP, Kendler KS, ... Khrunin A, Limborska S, Slominsky P ... Donohoe G, Gill M, Corvin A, Morris DW. Population-based identity-by-descent mapping combined with exome sequencing to detect rare risk variants for schizophrenia. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2019; 180(3):223-231.
4. Hess JL, Tylee DS, Mattheisen M, ... Khrunin A, Limborska S, Slominsky P ... Edenberg HJ, Holmans P, Faraone SV, Glatt SJ. A polygenic resilience score moderates the genetic risk for schizophrenia. Mol Psychiatry. 2019 Sep 6. [Epub ahead of print].
5. Руденок М.М., Алиева А.Х., Николаев М.А., Колачева А.А., Угрюмов М.В., Пчелина С.Н., Сломинский П.А., Шадрина М.И. Возможная роль генов, связанных с лизосомными болезнями накопления, в патогенезе болезни Паркинсона. Молекулярная биология. 2019. Т. 53. № 1. С. 28-36.
6. Taranov A.O., Puchkova A.N., Dorokhov V.B., Slominskii P.A., Tupitsyna T.V., Dementienko V.V. Association of chronotype, road traffic accidents, and polymorphisms in genes linked with the biological clock and the dopaminergic system. Neuroscience and Behavioral Physiology. 2019. Т. 49. № 1. С. 20-24.

## РАЗРАБОТКА ОРГАНИЗМЕННЫХ МОДЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ *DANIO RERIO* ДЛЯ АНАЛИЗА МОЛЕКУЛЯРНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ПАТОЛОГИЙ И ПОИСКА НОВЫХ ПОДХОДОВ К ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ

**Член-корр. С.В. Костров**

Лаборатория анализа клинических и модельных опухолевых патологий на организменном уровне

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

На основе развивающихся эмбрионов *Danio rerio* разработан набор экспериментальных моделей организменного уровня, предназначенных для анализа молекулярных и клеточных механизмов, вовлеченных в развитие опухолевых патологий. С их использованием, совместно с сотрудниками ФГБУН ИБХ РАН, проанализирован миграционный потенциал ряда опухолевых линий человека и продемонстрировано антиметастатическое действие мастер-гена *PDX1* на клетки опухоли протоковой аденокарциномы человека PANC1.

Разрабатываются подходы для анализа процессов активации фибробластов опухолевыми клетками *in vitro*. В качестве критериев активации используется количественная оценка экспрессии маркеров опухоль-ассоциированных фибробластов ( $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin), PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor)) и анализ морфологических изменений клеток.

На основе совместной трансплантации фибробластов и опухолевых клеток в развивающийся эмбрион *Danio rerio* разрабатывается экспериментальная модель, предназначенная для оценки влияния опухоль-ассоциированных фибробластов на миграционную активность опухолевых клеток на организменном уровне. В экспериментах использованы нативные фибробласты человека, а также фибробласты, активированные под воздействием клеток линий рака поджелудочной железы человека, характеризующихся высокой метастатической активностью.

Система на основе развивающихся эмбрионов *Danio rerio* впервые была использована для анализа возможных токсических эффектов, вызываемых индивидуальной протеиназой 3С вируса гепатита А человека на организменном уровне. Показано, что при

введении генетической конструкции, обеспечивающей экспрессию нативной протеиназы ЗС, наблюдаемая смертность животных значительно превышала контрольные значения. Полученные данные свидетельствуют об эмбриотоксическом действии протеиназы ЗС, связанном с ее энзиматической активностью.

## **НОВЫЙ БЕЛКОВЫЙ ИНГИБИТОР ПРОТЕАЗ – ГОМОЛОГ ПРОПЕПТИДА ПРОТЕАЛИЗИНА**

**д.б.н. И.В. Демидюк**

Лаборатория функциональной энзимологии  
ОМГОБиБИ

Протеализинподобные протеазы (ППП) – группа пептидаз, относящихся к семейству термолизина. Многие синтезирующие ППП бактерии являются патогенами растений и животных, некоторые – оппортунистическими патогенами человека. Имеются данные, указывающие на участие ППП во взаимодействии бактерий с высшими организмами. Однако биологические функции этих ферментов практически не изучены.

Недавно было показано, что в бактериальных геномах гены ППП ассоциированы с генами ингибиторов термолизинподобных протеаз. Обычно гены ингибиторов следуют за генами ППП. Как правило, ингибиторы гомологичны ингибитору протеализина из *Serratia proteamaculans*. Однако проведённый нами биоинформатический анализ показал, что у ряда бактерий, относящихся к роду *Xenorhabdus*, такие гены отсутствуют, а на их месте обнаружены гены небольших (8-10 кДа) гипотетических белков, гомологичных пропептиду протеализина. Ранее было установлено, что пропептид блокирует активный центр протеализина и является ингибитором этого фермента. Следовательно, можно предположить, что обнаруженные гипотетические белки также выполняют функцию ингибитора.

Для проверки этой гипотезы ген гомологичного пропептиду протеализина гипотетического белка из *Xenorhabdus nematophila* был синтезирован химико-ферментативным методом и экспрессирован в клетках *E. coli*. Рекombинантный белок был очищен методом металлохелатной аффинной хроматографии. Было

продемонстрировано, что полученный белок эффективно ингибирует протеализин, но практически не оказывает влияния на активность термолизина.

Таким образом, нами обнаружена новая группа гомологичных пропептиду протеализина белковых ингибиторов протеаз.

## **ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ФИБРОБЛАСТЫ КАК ВНУТРИОПУХОЛЕВЫЙ ИСТОЧНИК ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ**

**А.И. Кузьмич, О.А. Ракитина, М.В. Зиновьева, Д.А. Дидыч,  
к.б.н. И.В. Алексеенко**

Сектор генной онкотерапии ОМГОБиБИ

Использование лигандов, связывающихся с поверхностными рецепторами клеток, может приводить к увеличению эффективности доставки ДНК в клетки с помощью рекомбинантных носителей. Перспективной мишенью для доставки ДНК могут служить клетки опухолевой стромы, в том числе опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ). Их фенотип активирован опухолью, в связи с чем на поверхности ОАФ имеются специфические белковые маркеры. Одним из таких маркеров является рецептор фактора роста тромбоцитов PDGFRb, для которого описано несколько пептидных лигандов. Так, пептид  $\gamma$ G2 способен связываться с PDGFRb+ клетками и накапливаться внутри них. Мы предположили, что слияние гистона H2A с  $\gamma$ G2 способно улучшить эффективность доставки ДНК в ОАФ. Целью данной работы было получение рекомбинантного гистона H2A, слитого с лигандом к PDGFRb, и оценка его трансфицирующих свойств.

В ходе работы получена плаزمид, кодирующая H2A- $\gamma$ G2. Целевой белок наработан в бактериальной системе, выделен и очищен в два этапа с помощью ионообменной и обращено-фазовой ВЭЖ хроматографий. Выход очищенного белка составлял около 8,5 мг на литр культуры, чистота не менее 90%. В эксперименте по измерению подвижности ДНК в агарозном геле было показано, что H2A- $\gamma$ G2 способен связывать плазмидную ДНК не хуже, чем гистон H2A. Было проведено сравнение двух гистонов по эффективности доставки плазмидной ДНК, кодирующей двойной репортер (pCMV-EGFP-P2A-luc2), в Pdgfrb-позитивные (линия мышинных фибробластов

NIH-3T3) и негативные клетки (линия клеток почки эмбриона человека 293T). Клетки трансфицировали комплексами гистонов с плазмидной ДНК в различных N/P соотношениях, после чего определяли долю GFP+ клеток и измеряли активность люциферазы. В качестве положительного контроля использовался Lipofectamine2000.

В PDGFRB-позитивных клетках активность люциферазы при трансфекции комплексами с H2A-YG2 оказалась примерно в 5 раз выше, чем для H2A, в тоже время в PDGFRB-негативных клетках люциферазная активность после трансфекции обоими гистонами не различалась. Согласно данным проточной цитометрии при трансфекции PDGFRB-позитивных клеток модифицированным гистонам не происходило увеличение числа GFP-экспрессирующих клеток по сравнению с гистонами H2A, однако, наблюдалось значительное увеличение интенсивности флуоресценции GFP в трансфицированных клетках, что указывает на более высокий уровень его продукции. Такого прироста не наблюдалось в PDGFRB-негативных клетках, что указывает на участие этого рецептора в наблюдаемом улучшении трансфицирующих свойств H2A-YG2.

Таким образом, нам удалось подобрать условия выделения и очистки гистона H2AYG2 и показать, что введенная пептидная модификация приводит к улучшению трансфицирующих свойств гистона H2A в PDGFRB-позитивных клетках.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00852.

**Публикации Отдела молекулярно-генетических основ биотехнологии и белковой инженерии:**

1. Komissarov A.A., Kostrov S.V., Demidyuk I.V. In vitro assay for the evaluation of cytotoxic effects provided by a combination of suicide and killer genes in a bicistronic vector. // *Methods in Molecular Biology*. 2019. V. 1895. P. 135-147.
2. Zaitseva Y.V., Lipasova V.A., Plyuta V.A., Koksharova O.A., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Khmel I.A. Effect of inactivation of *luxS* gene on the properties of *Serratia proteamaculans* 94 strain. // *Folia Microbiol (Praha)*, 2019. V. 64. № 3. P. 265-272.
3. Chukhontseva K.N., Salnikov V.V., Morenkov O.S., Kostrov S.V., Demidyuk I.V. Protealysin is not secreted constitutively. // *Protein and Peptide Letters*, 2019. V. 26. № 3. P. 221-226.

4. Karaseva M.A., Chukhontseva K.N., Lemeskina I.S., Pridatchenko M.L., Kostrov S.V., Demidyuk I.V. An Internally Quenched Fluorescent Peptide Substrate for Protealysin. // *Scientific reports*, 2019. V. 9. № 1. P. 14352.
5. Zaitseva Yu., Koksharova O., Lipasova V., Plyuta V., Demidyuk I., Chernin L., Khmel I. SprI/SprR Quorum Sensing System of *Serratia proteamaculans* 94. // *BioMed Research International*, 2019. V. 2019. Article ID 3865780.
6. Kondratyeva L.G., Safina D.R., Chernov I.P., Kopantzev E.P., Kostrov S.V., Sverdlov E.D. PDX1, a key factor in pancreatic embryogenesis, can exhibit antimetastatic activity in pancreatic ductal adenocarcinoma // *Cancer Management and Research*. 2019. V. 11 P. 7077-7087.
7. Rettenmaier R., Liebl W., Zverlov V.V. *Anaerospaera multitolerans* sp. nov., a salt-tolerant member of the family Peptoniphilaceae isolated from a mesophilically-operated biogas fermenter fed with maize silage. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019.
8. Baudrexl M., Schwarz W.H., Zverlov V.V., Liebl W. Biochemical characterisation of four rhamnosidases from thermophilic bacteria of the genera *Thermotoga*, *Caldicellulosiruptor* and *Thermoclostridium*. *Scientific Reports* 2019. V. 9. № 1. P. 159249.
9. Rettenmaier R., Gerbaulet M., Liebl W., Zverlov V.V. *Hungateiclostridium mesophilum* sp. nov., a mesophilic, cellulolytic and spore-forming bacterium isolated from a biogas fermenter fed with maize silage. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2019. V. 69 P. 3567–3573.
10. Rykov S.V., Kornberger P., Herlet J., Tsurin N.V., Zorov I.N., Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H., Yarotsky S.V., Berezina O.V. Novel endo-(1,4)- $\beta$ -glucanase Bgh12A and xyloglucanase Xgh12B from *Aspergillus cervinus* belong to GH12 subgroup I and II, respectively. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019. V. 103. P. 7553-7566.
11. Rettenmaier R., Duerr C., Neuhaus K., Liebl W., Zverlov V.V. Comparison of sampling techniques and different media for the enrichment and isolation of cellulolytic organisms from biogas fermenters. // *Systematic and Applied Microbiology*. 2019. V. 42. P. 481-487.
12. Rettenmaier R., Neuhaus K., Liebl W., Zverlov V.V. Draft genome sequence of *Anaerospaera* sp. strain GS7-6-2, a coccal bacterium isolated from a biogas-related environment. // *Microbiol Resour Announc*. 2019. 8:e00205-19.
13. Новосадова Е.В., Арсеньева Е.Л., Антонов С.А., Ванюшина Ю.Н., Малова Т.В., Комиссаров А.А., Иллариошкин С.Н., Хаспекoв Л.Г., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Тарантул В.З., Гривенников И.А.

Применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека для оценки нейропротекторной активности фармакологических соединений. // Биохимия. 2019. Т. 84. № 11. С. 1610-1621.