

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ
НАЦИОНАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО
ЦЕНТРА «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»**

**XXIX ЕЖЕГОДНАЯ НАУЧНАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ**

11-12 апреля 2022 г., Москва

ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

11 апреля, понедельник

Утреннее заседание, начало в 10:30

Открытие конференции

Вступительное слово директора
НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ
члена-корреспондента РАН С.В. КОСТРОВА (20 мин)

Председатель – С.В. Костров

В.А. ГВОЗДЕВ – руководитель Отдела молекулярной генетики клетки (ОМГК). «Межхромосомные взаимодействия, регуляторный способ селективного удаления микроРНК и комплекс NAC в герминальных клетках дрозофилы (понемного о разном)». (25 мин)

Ю.Я. ШЕВЕЛЕВ – зав. Лабораторией анализа регуляции генов ОМГК. «Влияние нуклеопорина Elys на геномную архитектуру у дрозофилы». (20 мин)

М.С. КЛЕНОВ – с.н.с. Лаборатории биохимической генетики животных ОМГК. «Регуляция транскрипции белок-кодирующих и рибосомных генов, ассоциированных с инсерциями мобильных элементов у дрозофилы». (15 мин)

А.А. КОТОВ – с.н.с. Лаборатории биохимической генетики животных ОМГК. «Функции компонентов piRNA-пути в поддержании гаметогенеза, регуляция белок-кодирующих генов и механизмы гибридной стерильности у дрозофилы». (15 мин)

П е р е р ы в (15 мин)

Председатель – И.А. Гривенников

А.В. КУЛЬБАЧИНСКИЙ – зав. Лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов (ЛМГК) ОМГК. «Транскрипция и повреждения ДНК у бактерий». (20 мин)

М.А. ПЕТРОВА – зав. Сектором анализа и хранения микроорганизмов ЛМГМ ОМГК. «Механизмы быстрой адаптации представителей рода *Acinetobacter*». (15 мин)

Д.М. ЕСЮНИНА – зав. Лабораторией биологии РНК и эпигенетики. «Свойства белков-Аргонавтов прокариот из новых групп». (20 мин)

П е р е р ы в**Вечернее заседание, начало в 16:00****Председатель – А.В. Кульбачинский**

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

А.И. КАЛМЫКОВА – зав. Лабораторией исследования геномных повторов эукариот. «Молекулярная природа нарушений развития при дисфункции теломер у *Drosophila*». (20 мин)

С.А. ЛИМБОРСКАЯ – руководитель Отдела молекулярных основ генетики человека (ОМОГЧ). «Поиск и изучение полиморфизма генов человека, ортологи которых задействованы в реакцию на экспериментальную ишемию мозга в модельных системах». (20 мин)

Л.В. ДЕРГУНОВА – зав. Лабораторией функциональной геномики ОМОГЧ «Изучение транскриптомного ответа генома клеток мозга на воздействие пептидов в норме, при остром стрессе и экспериментальной ишемии». (20 мин)

12 апреля, вторник

Утреннее заседание, начало в 10:30

Председатель – П.А. Сломинский

Н.Ф. МЯСОЕДОВ – зав. Лабораторией молекулярной фармакологии пептидов. «Исследование структуры и функции природных пептидов с целью создания новых лекарственных препаратов, оптимизация структуры кандидатных пептидов, разработка схем синтеза, включая получение меченных дейтерием и тритием физиологически активных соединений». (30 мин)

И.А. ХМЕЛЬ – зав. Лабораторией регуляции экспрессии генов микроорганизмов. «Функциональная роль вторичных метаболитов в регуляции экспрессии генов бактерий». (20 мин)

В.З. ТАРАНТУЛ – зав. Лабораторией молекулярной нейрогенетики и врожденного иммунитета. «Исследование молекулярных механизмов болезни паркинсона». (20 мин)

П е р е р ы в (15 мин)

Председатель – Е.Г. Пасюкова

А.В. МАКАРОВА – зав. Лабораторией механизмов репликации поврежденной ДНК. «Праймаза ДНК-полимераза человека PrimPol». (20 мин)

Е.И. КЛИМУК – ст.н.с. Лаборатории регуляции экспрессии генов мобильных элементов прокариот. «Персистенция плазмид в условиях CRISPR интерференции». (20 мин)

П.А. СЛОМИНСКИЙ – зав. Лабораторией молекулярных основ наследственных болезней. «Анализ транскриптома лимфоцитов периферической крови у пациентов с тяжелой

формой COVID-19: роль метаболического пути рецептора ЛНП в определении траектории развития заболевания». (20 мин)

Вечернее заседание, начало в 16:00

Председатель – Ю.Я. Шевелев

С.В. КОСТРОВ – руководитель Отдела молекулярно-генетических основ биотехнологии и белковой инженерии (ОМГОБиБИ). «Анализ молекулярных и клеточных механизмов, вовлеченных в контроль миграционной активности опухолей». (30 мин)

И.В. ДЕМИДЮК – зав. Лабораторией функциональной энзимологии ОМГОБиБИ. «Новое семейство I104 белковых ингибиторов протеаз». (20 мин)

И.В. АЛЕКСЕЕНКО – зав. Сектором генной онкотерапии ОМГОБиБИ. «Изучение фармакокинетики генотерапевтического противоопухолевого препарата АнтионкоРАН-М». (15 мин)

Заключительное слово директора
НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ
члена-корреспондента РАН С.В. КОСТРОВА.

Заккрытие конференции

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

МЕЖХРОМОСОМНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, РЕГУЛЯТОРНЫЙ СПОСОБ СЕЛЕКТИВНОГО УДАЛЕНИЯ микроРНК И КОМПЛЕКС НАС В ГЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ДРОЗОФИЛЫ (ПОНЕМНОГУ О РАЗНОМ)

Академик В.А. Гвоздев

Лаборатория биохимической генетики животных
Отдела молекулярной генетики клетки (ОМГК)

Хромосомная перестройка *In(2)A4* вызывает гетерохроматиновый эффект положения генов и репортерных трансгенов вблизи новых *эу*-гетерохроматиновых границ (цис-инактивация), а также транс-инактивацию репортерных трансгенов на нормальной (неперестроенной) гомологичной хромосоме. Явление транс-инактивации наблюдается несравненно реже, чем цис-инактивация. При транс-инактивации район нормальной хромосомы должен гетерохроматинизироваться *de novo* в результате перемещения в другой ядерный компартмент за счет соматического спаривания гомологов. Чтобы получить данные о распределении гетерохроматиновых белков отдельно для нормальной и перестроенной хромосом, была сконструирована гетерозиготная линия мух, у которой хромосома *A4* находится в паре с хромосомой дикого типа, отличающейся от *A4* нуклеотидными заменами с частотой примерно 1 замена на 500-1000 п.н. На этой линии был проведен ChIP-Seq антителами к белку HP1a, а также к модификациям гистонов H3K4me3 и H3K9me3. В результате проведенного анализа с использованием специальных биоинформатических процедур, нам впервые удалось прямо показать формирование гетерохроматина, сопровождающееся обогащением HP1a, на хромосоме дикого типа, находящейся в паре с вызывающей транс-инактивацию хромосоме с перестройкой. Обогащение HP1a в нормальной хромосоме происходит в области, где находятся три гена, для которых ранее нами было показано снижение уровня транскрипции при цис-инактивации в *In(2)A4*. По-видимому, эти гены находятся в районе со специфической конформацией хроматина, обеспечивающей как подверженность цис-инактивации в инверсии, так и связывание HP1a с районом нормальной хромосомы под влиянием инверсии.

Недавно у животных был обнаружен новый механизм деградации микроРНК – target-directed miRNA degradation (TDMD). При образовании дуплекса между микроРНК, находящейся в комплексе с белком-аргонавтом, и мРНК-мишенью как правило происходит быстрый распад мРНК. Однако, когда комплементарность между микроРНК и мРНК присутствует и на 3'-конце микроРНК, происходит, наоборот, быстрая деградация микроРНК. Предполагается, что при участии белка ZSWIM8, привлекающего убиквитинлигазу к комплексу, белок-аргонавт убиквитинилируется и разрушается, что приводит к высвобождению микроРНК, которая затем разрушается неизвестными экзонуклеазами. Этот механизм функционирует у позвоночных в нейронах мозга, отвечающих за двигательную активность, а также способствует развитию заболеваний, вызванных герпесвирусами. Нами проверяется возможность участия TDMD-регуляции в формировании и функционировании репродуктивной системы у дрозофилы. Мы показали, что нокаут гена *Dora* в культуре соматических клеток яичников дрозофилы, который является ортологом ZSWIM8 млекопитающих, приводит к возрастанию экспрессии *mir-7*, что ранее наблюдалось в нейронах млекопитающих и демонстрирует присутствие TDMD-регуляции у дрозофилы. Нами создана линия дрозофилы, в которой белок *Dora* помечен тегом HA. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания показано, что *Dora*-HA активнее всего экспрессируется в герминальных клетках яичников (в предшественниках и питающих ооцит клетках), а также в специализированных соматических клетках. Полученные данные подтверждают функционирование TDMD в ходе оогенеза у дрозофилы и создают основу для дальнейшего изучения этого явления.

Продолжены исследования ассоциированного с рибосомами герминального паралога повсеместно экспрессируемого белка NAC (nascent polypeptide associated complex), ответственного за клеточный протеостаз белка. Так же как и повсеместно экспрессирующийся NAC комплекс, герминально-специфичный NAC является гетеродимером, состоящим из α - и β -субъединиц. Однако герминально-специфичный комплекс отличается от вездесущего приобретением на N-конце α -субъединицы и C-конце β -субъединицы неструктурированных протяженных аминокислотных участков, склонных к белок-белковым взаимодействиям, пост-трансляционным модификациям и

образованию биоконденсатов. С помощью биоинформатического анализа нами были предсказаны многочисленные сайты фосфорилирования в обеих субъединицах герминально-специфичного NAC, а их наличие в β -субъединице и их исчезновение в результате обработки фосфатазой было показано методом изоэлектрофокусирования с последующей детекцией пятен иммуноокрашиванием. Герминально-специфичный NAC активно экспрессируется в семенниках и несравненно слабее – в ооцитах. В зрелом ооците NAC накапливается на заднем полюсе в герминальной плазме, необходимой для дифференцировки первых после дробления ядер, окруженных мембраной герминальных клеток, дальнейшая миграция и деление которых приводят к образованию гонад. Мы предполагаем, что вновь возникшие в эволюции неструктурированные протяженные участки α - и β -субъединиц герминально-специфичного NAC определяют особенности регуляции протеостаза в герминальной плазме и в примордиальных клетках зародышевого пути.

ВЛИЯНИЕ НУКЛЕОПОРИНА ELYS НА ГЕНОМНУЮ АРХИТЕКТУРУ У ДРОЗОФИЛЫ

к.б.н. Ю.Я. Шевелев

Лаборатория анализа регуляции генов ОМГК

Хотя идея о том, что хромосомы в интерфазном ядре прикреплены к ядерной оболочке, была высказана довольно давно (Comings 1968), механизмы, отвечающие за это прикрепление, все еще плохо изучены. Накапливаются данные, показывающие, что периферический хроматин находится в тесном контакте как с ядерной ламиной, так и с ядерными порами. Области генома, взаимодействующие с ядерной ламиной (т.н. ламино-ассоциированные домены, ЛАДы), были картированы у различных организмов. Было также установлено, что геномы разных организмов взаимодействуют с нуклеопоринами (т.е. белками, входящими в комплексы ядерных пор). Однако в отличие от дрожжей, у многоклеточных взаимодействия нуклеопоринов с хроматином могут происходить не только на ядерной оболочке, но и внутри ядра.

Elys является единственным известным нуклеопорином, который может прямо связывать хроматин с ядерными пораами, поскольку он содержит ДНК-связывающий AT-hook мотив, распознающий AT-богатые последовательности, и дополнительный белковый домен, способный связываться с нуклеосомами. Кроме того известно, что Elys участвует в закладке ядерных пор в восстанавливающуюся ядерную оболочку в конце митоза путем связывания деконденсирующегося хроматина с Nup170-160 субкомплексом ядерных пор. До недавнего времени Elys дрозофилы не был охарактеризован. В 2020 году было показано, что нокадаун Elys в слюнных железах личинок дрозофилы вызывает апоптоз и исчезновение ядерных пор с ядерной оболочки (Mehta et al. 2020). Кроме того, в недавних работах из лаборатории Майи Капельсон (Pascual-Garcia et al. 2017; Gozalo et al. 2020) методом ChIP-seq были определены сайты связывания Elys с геномом в мозге личинок и в клетках S2 дрозофилы. Однако геномные участки, с которыми связывается Elys, не были разделены на сайты связывания в нуклеоплазме и сайты связывания в составе ядерных пор.

Целью нашей работы было выяснение того, как Elys, находясь в составе ядерных пор или в нуклеоплазме, влияет на состояние хроматина и на экспрессию генов, и участвует ли он в прикреплении хроматина к ядерным порам. Мы установили, что в отличие от слюнных желез, деплеция Elys в клетках S2 дрозофилы не приводит к усилению апоптоза и к исчезновению ядерных пор с ядерной оболочки. Таким образом, клетки S2 являются подходящей модельной системой для анализа влияния Elys на геномную архитектуру. Затем методом DamID мы картировали геномные участки, с которыми взаимодействует Elys в 16-18-часовых эмбрионах дрозофилы, и выделили среди них консервативные сайты, с которыми Elys связан, находясь в составе ядерных пор, либо с которыми он связан в нуклеоплазме. Подтверждением того, что мы действительно установили участки связывания хроматина с ядерными пораами, является тот факт, что выявленные сайты связывания с пораами, находящиеся внутри ЛАДов, имеют низкий уровень ацетилирования гистонов и при этом соответствуют провалам в профиле ламина. Проведенная нами флуоресцентная гибридизация *in situ* с зондами к двум участкам ЛАДов показала, что при деплеции Elys в клетках S2 происходит смещение этих районов с ядерной оболочки внутрь ядра.

Таким образом, мы показали, что Elys, наравне с ламинном, участвует в прикреплении периферического хроматина к ядерной оболочке.

Чтобы выяснить, как Elys влияет на плотность упаковки хроматина, с которым он связан внутри ядра или в составе ядерных пор, совместно с лабораторией С.В. Разина (ИБГ РАН) были проведены эксперименты Hi-C в контрольных клетках S2 и клетках с деплецией Elys. Усредненные тепловые Hi-C карты, центрированные вокруг различных типов сайтов Elys, показали, что частота контактов внутри геномных участков, прикрепленных к ядерным порам, повышена по сравнению с окружающими районами. Частота контактов внутри геномных участков, с которыми Elys связан в нуклеоплазме, оказалась также выше, чем между этими сайтами и соседними районами. Эти результаты указывают на то, что участки хроматина, с которыми связан Elys как в составе ядерных пор, так и в нуклеоплазме, имеют особую конформацию, облегчающую контакты внутри этих сайтов, но предотвращающую контакты этих сайтов с окружающим хроматином. Чтобы проанализировать влияние Elys на экспрессию генов, мы провели RNA-seq анализ в контрольных клетках S2 и клетках с деплецией Elys. В контрольных клетках S2 экспрессия генов, связанных с Elys в нуклеоплазме, оказалась заметно выше, чем экспрессия генов, связанных с Elys в составе ядерных пор, что хорошо коррелирует с уровнем ацетилирования гистонов в этих участках. При этом, деплеция Elys приводила к повышению экспрессии приблизительно на 10% у слабо экспрессирующихся генов, в то время как активно экспрессирующиеся гены в большинстве своем не меняли своей экспрессии. В целом, деплеция Elys в клетках S2 оказывает довольно слабое влияние на экспрессию генов.

Таким образом, мы обнаружили, что Elys является ключевым компонентом ядерных пор, вместе с ядерной ламинной ответственным за поддержание связи между хроматином и ядерной оболочкой, что значительно углубляет наши представления о фундаментальных механизмах организации хроматина в интерфазном ядре.

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ БЕЛОК-КОДИРУЮЩИХ И РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ИНСЕРЦИЯМИ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ У ДРОЗОФИЛЫ

М.С.Кленов

Лаборатория биохимической генетики животных ОМГК

Вставки мобильных элементов (МЭ) в геномах эукариот обычно характеризуются репрессивным хроматином, который может также распространяться на соседние с МЭ геномные последовательности. У *Drosophila melanogaster* белок Piwi, взаимодействующий с короткими piРНК, играет ключевую роль в транскрипционной репрессии МЭ преимущественно за счет установления гистоновой метки H3K9me3, которая связывается белком гетерохроматина HP1a. Однако, этот механизм функционирует в основном в клетках яичников, где МЭ способны к наиболее высокой экспрессии и транспозиционной активности. С помощью RNA-seq мы исследовали экспрессию МЭ и соседствующих с ними геномных областей при нокадаунах Piwi и HP1a в герминальных клетках яичников дрозофилы (Ilyin et al. 2021). Мы обнаружили, что, помимо МЭ, нокадауны Piwi и HP1a приводят к активации транскрипции небольшого набора белок-кодирующих генов, расположенных вблизи инсерций МЭ в эухроматине. Таким образом, в яичниках дикого типа транскрипция этих генов, по-видимому, подавляется благодаря распространению от сайтов встроок МЭ репрессивного хроматина, который может формироваться за счет Piwi. Интересно, что для большинства регулируемых таким образом генов характерен «провал» экспрессии в яичниках по сравнению с другими органами. На основе этих результатов мы предполагаем, что система Piwi-piRNA может играть роль тканеспецифического репрессора транскрипции, подавляя экспрессию определенных генов, соседствующих с инсерциями МЭ, исключительно в клетках яичников.

Эукариотические геномы содержат сотни генов рДНК, кодирующих рибосомную РНК (рРНК), многие из которых являются транскрипционно неактивными. Однако механизмы, определяющие реPRESSION или активацию отдельных копий повторов рДНК, остаются малоисследованными. Особенностью локуса рДНК дрозофилы является присутствие ретротранспозонов R1 и R2, которые встраиваются в строго определенные сайты в последовательности, кодирующей 28S рРНК. Элементы R2 не имеют собственного промотора и могут транскрибироваться только как часть молекулы пре-рРНК, из которой РНК R2 высвобождается в ходе автосплайсинга. Единицы рДНК со вставками R2 обычно инактивированы, хотя экспрессия R2 может быть полезной в клетках с уменьшенным числом копий рДНК, поскольку предполагается, что кодируемая элементом R2 нуклеаза способна индуцировать рекомбинационные процессы,

стимулируя восстановление количества единиц рДНК. Мы обнаружили, что нарушение компонентов белкового комплекса SL1-like, который участвует в инициации транскрипции с помощью РНК-полимеразы I (Pol I), приводит к дерепрессии повторов рДНК с инсерциями на два порядка (Fefelova et al. 2022). SL1-like комплекс дрозофилы был описан как аналог комплекса SL1 млекопитающих, который способствует транскрипции рДНК, узнавая и связывая промоторную последовательность рДНК и привлекая Pol I. Предположительно, нарушение SL1-like комплекса влияет на механизм избирательной активации интактных единиц рДНК. Мы также предполагаем, что дерепрессия обычно молчащих генов рДНК с преимущественной активацией элемента R2 может быть индуцирована транскрипционным репрограммированием, которое является адаптивным ответом на снижение уровня синтеза рРНК.

ФУНКЦИИ КОМПОНЕНТОВ рiРНК-ПУТИ В ПОДДЕРЖАНИИ ГАМЕТОГЕНЕЗА, РЕГУЛЯЦИЯ БЕЛОК-КОДИРУЮЩИХ ГЕНОВ И МЕХАНИЗМЫ ГИБРИДНОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ У ДРОЗОФИЛЫ

к.б.н. А.А.Котов

Лаборатория биохимической генетики животных ОМГК

РНК-хеликаза *Vasa*, способная активировать трансляцию мРНК, является консервативным маркером герминальных клеток у широкого круга животных от нематоды до человека. Многие молекулярные аспекты функционирования *Vasa* (впервые идентифицированной у дрозофилы в оогенезе) в сперматогенезе дрозофилы остаются невыясненными. Мы показали, что мутации *vasa* приводят к уменьшению количества герминальных стволовых клеток (ГСК) и снижению фертильности самцов. Анализ мРНК, ко-иммунопреципитирующихся с белком *Vasa* из лизатов семенников и яичников, выявил (кроме мРНК *Vasa*) в основном мРНК белков *Rhino* и *Aub*, участвующих в биогенезе рiРНК, причем мутация *Vasa* приводит к снижению количества мРНК этих белков. У самцов, мутантных по *rhino*, выявляются нарушения образования ГСК, сходные с эффектом от мутаций *vasa*.

Мы не обнаружили заметного изменения морфологии семенников и числа ГСК при мутации *aubergine*, поэтому нарушение piPНК-пути в семенниках вряд ли является причиной преждевременной потери герминальных клеток, вызванной нарушением функции гена *vasa*. Обнаруженная ассоциация mPНК Rhino с белком Vasa предполагает не связанные с биогенезом piPНК транскрипционные функции Rhino, существенные для поддержания ГСК и раннего сперматогенеза.

Анализ полученных ранее библиотек семенник-специфичных piPНК позволил идентифицировать кластеры, способные производить piPНК к белок-кодирующим генам в семенниках *D. melanogaster*, подчеркивая их роль в регуляции генной экспрессии, а не только в репрессии активности транспозонов. Кластер *petrel*, идентифицированный нами у самцов на Y-хромосоме, производит большое количество piPНК к X-хромосомному гену *pirate* (кодирующему SUMO-пептидазу), подавляя его экспрессию в семенниках. piPНК-кластер *petrel* оказался видоспецифичным и отсутствующим у близкородственных видов клады *Simulans*. Интересно, что у близкородственного вида *D. mauritiana* нами обнаружены siPНК, комплементарные гомологу гена *pirate*. Присутствие siPНК у близкородственного вида вместо piPНК *D. melanogaster* говорит о недавнем возникновении piPНК-зависимого механизма репрессии.

В результате межвидовых скрещиваний *D. melanogaster* и *D. simulans* нам удалось получить жизнеспособных гибридных самок с развитыми яичниками примерно в 20% случаев. В таких яичниках Vasa *D. melanogaster* не экспрессируется на ранних стадиях оогенеза. Тем не менее, у части гибридных самок закладка герминальных клеток и последующее формирование овариол происходит, но такие самки остаются стерильными. Наши дальнейшие исследования будут направлены на поиск молекулярных механизмов стерильности таких гибридов.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ КОНТРОЛЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ У ДРОЗОФИЛЫ

д.б.н. Е.Г. Пасюкова

Лаборатория геномной изменчивости ОМГК

Для высших эукариот характерен сложный многоуровневый контроль реализации генетической информации. Выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе взаимосвязи между экспрессией генов и фенотипом, является фундаментальной научной задачей, принципиально важной для понимания основ развития, жизни и старения живых организмов. Регуляция транскрипции является важнейшим этапом, определяющим характер экспрессии генов в целом. Она зависит от взаимодействия различных регуляторных элементов, локализованных в некодирующей ДНК, и регуляторных белков. Регуляторные элементы характеризуются значительной структурной изменчивостью, которая может влиять на уровень транскрипции и, в конечном итоге, на индивидуальные фенотипические особенности живого организма. Выяснение механизмов регуляции транскрипции, лежащих в основе индивидуальной изменчивости, представляет собой важную задачу фундаментальной науки.

Целью одного из направлений работы лаборатории геномной изменчивости является исследование природной структурной изменчивости регуляторных областей генов *shuttle craft (stc)* и *escargot (esg)* *D. melanogaster*, определяющих важный интегральный количественный признак – продолжительность жизни – и роли этой структурной изменчивости в регуляции транскрипции.

В 2020-2021 гг. был проведен биоинформатический анализ 5' и 3' регуляторных районов генов *stc* и *esg* и выявлены предсказанные сайты связывания регуляторных белков и другие регуляторные элементы. Была охарактеризована изменчивость 5' и 3' регуляторных районов генов *stc* и *esg* у мух, собранных в популяциях Александров, Валдай (Россия), Киев (Украина) и Ешилос (Турция): выявлены сегрегирующие в популяциях полиморфизмы, проведено сравнение их частот в разных популяциях. Проанализирована ассоциация выявленных сегрегирующих полиморфизмов с продолжительностью жизни мух и условиями среды обитания популяций. Показано, что продолжительность жизни связана с изменчивостью, по крайней мере, двух полиморфных локусов, расположенных в 5' регуляторном районе гена *stc*. Изменчивость этих же полиморфных локусов связана с температурой воздуха в местах обитания популяций. Показано, что от того, какой нуклеотид находится в каждом из двух полиморфных локусов, зависит транскрипция гена *stc* и экспрессия репортерного гена в культуре клеток дрозофилы.

Проведенная работа позволила выделить функционально важные в естественных условиях сайты регуляторных районов генов и охарактеризовать функциональное значение их природной изменчивости для контроля транскрипции, фенотипа и экологической адаптации. Полученный результат указывает также на роль регуляции экспрессии гена *stc* в контроле продолжительности жизни и открывает возможности для дальнейшего исследования роли полиморфных сайтов в регуляции транскрипции.

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

1. Pashkovskiy P, Ryazansky S, Kartashov A, Voloshin R, Khudyakova A, Kosobryukhov AA, Kreslavski VD, Kuznetsov VV, Allakhverdiev SI. Effect of red light on photosynthetic acclimation and the gene expression of certain light signalling components involved in the microRNA biogenesis in the extremophile *Eutrema salsugineum*. *J. Biotechnol.*, 2021, 325:35–42. doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.11.018.
2. Ilyin AA, Stolyarenko AD, Zenkin N, Klenov MS. Complex genetic interactions between Piwi and HP1a in the repression of transposable elements and tissue-specific genes in the ovarian germline. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22:13430. doi: 10.3390/ijms222413430.
3. Adashev VE, Kotov AA, Bazylev SS, Shatskikh AS, Aravin AA, Olenina LV. Stellate genes and the piRNA pathway in speciation and reproductive isolation of *Drosophila melanogaster*. *Front. Genet.*, 2021, 11:610665. doi: 10.3389/fgene.2020.610665.
4. Chen P, Kotov AA, Godneeva BK, Bazylev SS, Olenina LV, Aravin AA. piRNA-mediated gene regulation and adaptation to sex-specific transposon expression in *D. melanogaster* male germline. *Genes Dev.*, 2021, 35:914–935. doi: 10.1101/gad.345041.120.
5. Gilmutdinov R, Kozlov EN, Yakovlev KV, Olenina LV, Kotov AA, Barr J, Zhukova M, Schedl P, Shidlovskii YV. The 3'UTR of the *Drosophila* CPEB translation factor gene *orb2* plays a crucial role in spermatogenesis. *Development*, 2021, 148:dev198788. doi: 10.1242/dev.198788.
6. Ulianov SV, Zakharova VV, Galitsyna AA, Kos PI, Polovnikov KE, Flyamer IM, Mikhaleva EA, Khrameeva EE, Germini D, Logacheva MD, Gavrillov AA, Gorsky AS, Nechaev SK, Gelfand MS, Vassetzky YS, Chertovich AV, Shevelov YY, Razin SV. Order and stochasticity in the folding of individual

Drosophila genomes. Nat. Commun., 2021, 12:41. doi: 10.1038/s41467-020-20292-z. PMID: 33397980; PMCID: PMC7782554.

7. Базылев СС, Адашев ВЕ, Шацких АС, Оленина ЛВ, Котов АА. Соматические клетки цисты как микроокружение для поддержания и дифференцировки герминальных клеток в сперматогенезе *Drosophila*. Онтогенез, 2021, 52:27–45. doi: 10.31857/S047514502101002X

8. Ilyin AA, Stolyarenko AD, Klenov MS, Shevelyov YY. Various modes of HP1a interactions with the euchromatic chromosome arms in *Drosophila* ovarian somatic cells. Chromosoma, 2020, 129:201–214. doi: 10.1007/s00412-020-00738-5.

9. Shevelyov YY. The role of nucleoporin Elys in nuclear pore complex assembly and regulation of genome architecture. Int. J. Mol. Sci., 2020, 21:9475. doi: 10.3390/ijms21249475.

10. Sokolova OA, Mikhaleva EA, Kharitonov SL, Abramov YA, Gvozdev VA, Klenov MS. Special vulnerability of somatic niche cells to transposable element activation in *Drosophila* larval ovaries. Sci. Rep., 2020 10:1076. doi: 10.1038/s41598-020-57901-2.

11. Kotov AA, Godneeva BK, Olenkina OM, Adashev VE, Trostnikov MV, Olenina LV. The *Drosophila* RNA helicase Belle (DDX3) non-autonomously suppresses germline tumorigenesis via regulation of a specific mRNA set. Cells, 2020 9:550. doi: 10.3390/cells9030550.

12. Солодовников АА, Гвоздев ВА, Лавров СА. Высокий уровень транскрипции гена на стадии эмбриона приводит к подавлению его гетерохроматиновой транс-инактивации у взрослых особей *Drosophila melanogaster*. Биохимия, 85:547–555. doi: 10.31857/S0320972520040077.

13. Shatskikh AS, Kotov AA, Adashev VE, Bazylev SS, Olenina LV. Functional significance of satellite DNAs: insights from *Drosophila*. Front. Cell Dev. Biol., 2020, 8:312. doi:10.3389/fcell.2020.00312.

14. Kuzmenko A, Oguienko A, Esyunina D, Yudin D, Petrova M, Kudinova A, Maslova O, Ninova M, Ryazansky S, Leach D, Aravin AA, Kulbachinskiy A. DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease. Nature, 2020, 587:632–637. doi: 10.1038/s41586-020-2605-1.

15. Kordyukova M, Sokolova O, Morgunova V, Ryazansky S, Akulenko N, Glukhov S, Kalmykova A. Nuclear Ccr4-Not mediates the degradation of telomeric and transposon transcripts at chromatin in the *Drosophila* germline. Nucleic Acids Res., 2020, 48:141–156. doi: 10.1093/nar/gkz1072.

16. Ceysens PJ, De Smet J, Wagemans J, Akulenko N, Klimuk E, Hedge S, Voet M, Hendrix H, Paeshuysse J, Landuyt B, Xu H, Blanchard J, Severinov K,

- Lavigne R. The phage-encoded N-acetyltransferase Rac mediates inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* transcription by cleavage of the RNA polymerase alpha subunit. *Viruses*, 2020, 12:976. doi: 10.3390/v12090976.
17. Klimuk E, Mekler V, Lavysh D, Serebryakova M, Akulenko N, Severinov K. Novel *Escherichia coli* RNA polymerase binding protein encoded by bacteriophage T5. *Viruses*, 2020, 12:807. doi: 10.3390/v12080807.
18. Komarov PA, Sokolova O, Akulenko N, Brasslet E, Jensen S, Kalmykova A. Epigenetic requirements for triggering heterochromatinization and Piwi-interacting RNA production from transgenes in the *Drosophila* germline. *Cells*, 2020, 9:922. doi: 10.3390/cells9040922.
19. Kapun M, Nunez JCB, Bogaerts-Márquez M, ..., Pasyukova E, Alatorsev VE, ..., Bergland AO. *Drosophila* evolution over space and time (DEST): a new population genomics resource. *Mol. Biol. Evol.*, 2021, 38:5782-5805. doi: 10.1093/molbev/msab259.
20. Pasyukova EG, Symonenko AV, Rybina OY, Vaiserman AM. Epigenetic enzymes: A role in aging and prospects for pharmacological targeting. *Ageing Res. Rev.*, 2021, 67:101312. doi: 10.1016/j.arr.2021.101312.
21. Trostnikov MV, Veselkina ER, Kremntsova AV, Boldyrev SV, Roshina NV, Pasyukova EG. Modulated expression of the protein kinase GSK3 in motor and dopaminergic neurons increases female lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Front. Genet.*, 2020, 11:668. doi: 10.3389/fgene.2020.00668.
22. Kapun M, Barrón MG, Staubach F, ..., Pasyukova EG, ..., González J. Genomic analysis of european *Drosophila melanogaster* populations reveals longitudinal structure, continent-wide selection, and previously unknown DNA viruses. *Mol. Biol. Evol.*, 2020, 37:2661–2678. doi: 10.1093/molbev/msaa120.
23. Pasyukova EG, Symonenko AV, Rybina OY. Epigenetic Drugs. In: Rattan, S.I.S. (Ed.), *Encyclopedia of Biomedical Gerontology*, Academic Press, vol. 2, pp. 11–26, 2020. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.11298-X.

ТРАНСКРИПЦИЯ И ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК У БАКТЕРИЙ

д.б.н. А.В. Кульбачинский

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов (ЛМГМ)
ОМГК

Процессы транскрипции и репарации ДНК в бактериальной клетке тесно связаны друг с другом. РНК-полимераза служит сенсором повреждений ДНК, участвуя в узнавании модифицированных нуклеотидов и привлекая к ним факторы эксцизионной репарации. В то же время, РНК-полимераза является одним из основных препятствий для репликации ДНК, особенно в интенсивно транскрибируемых участках. Столкновения РНК-полимеразы и реплисома приводят к остановке репликации и повреждениям геномной ДНК и нарушают деление клетки. Поддержание стабильности генома зависит от действия регуляторных факторов, обеспечивающих баланс между успешной репликацией, транскрипцией и репарацией повреждений ДНК. Наша работа посвящена исследованию механизмов транскрипции поврежденных участков ДНК в системах *in vitro* и *in vivo*, изучению регуляции активности РНК-полимеразы в таких участках, а также сопряжения перечисленных процессов в бактериальной клетке. Нами показано, что бактериальная РНК-полимераза способна узнавать широкий спектр модифицированных нуклеотидов *in vitro*, что может приводить к синтезу ошибочной РНК, паузам и остановкам транскрипции. Изучена роль регуляторных факторов, влияющих на устойчивость клеток к ДНК-повреждающим агентам *in vivo*, а также на узнавание поврежденных нуклеотидов РНК-полимеразой и остановку транскрипции *in vitro*. В частности, исследован механизм регуляции транскрипции белком DksA, который подавляет активность РНК-полимеразы в стрессовых условиях. Исследованы мутации в РНК-полимеразе, повышающие устойчивость клеток к ДНК-повреждающим агентам и снижающие интенсивность конфликтов транскрипции и репликации. Показано, что основной эффект этих мутаций связан со снижением активности промоторов рРНК. Таким образом, транскрипция небольшого числа наиболее активных генов может играть ключевую роль в возникновении повреждений ДНК в ходе конфликтов с репликацией. Получены новые экспериментальные системы для исследования таких конфликтов, а также процессов мутагенеза в определенном геномном локусе в клетках бактерий. Разработан новый подход к детекции разрывов ДНК с использованием прокариотических белков-Аргонавтов. Показано, что белки-Аргонавты могут служить сенсорами повреждений ДНК в клетке.

МЕХАНИЗМЫ БЫСТРОЙ АДАПТАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ACINETOBACTER*

д.б.н. М.А. Петрова

Сектор анализа и хранения микроорганизмов ЛМГМ ОМГК

Штаммы *Acinetobacter* (*A.*) представляют особый интерес в связи с огромным разнообразием мест их обитания и множеством обнаруженных у них метаболических способностей. В последние годы, благодаря развитию и широкому применению технологий NGS и имеющейся у нас возможности сравнивать геномы древних и современных штаммов, нами были получены данные, проливающие свет на механизмы, обеспечивающие удивительную пластичность штаммов *A.* При сравнении геномов древних штаммов *A. lwoffii* из вечной мерзлоты и современных штаммов этого вида мы не обнаружили никаких существенных различий в последовательностях хромосом, которые отличали бы штаммы вечной мерзлоты от современных штаммов, в том числе и клинических. А вот сравнение древних природных плазмид, обнаруженных в штаммах *A. lwoffii*, выделенных из многолетнемерзлых отложений, с современными плазмидами позволило ясно проследить процессы адаптации и показало, что плазмиды играют в этом ведущую роль. У штаммов *A.* на плазмидах постоянно происходит сборка новых комбинаций генов. В этом процессе у *A.* задействованы не только механизмы, присущие другим бактериям, но и имеется арсенал своих собственных. Это позволяет штаммам *A.* быстро приобретать гены, необходимые для приспособления к условиям среды. Для клинических штаммов это преимущественно гены устойчивости к различным антибиотикам, а для природных - опероны устойчивости к различным тяжелым металлам и другим стрессовым факторам окружающей среды.

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

1. Kropocheva E, Kuzmenko A, Aravin AA, Esyunina D, Kulbachinskiy A. 2021. A programmable pAgo nuclease with universal guide and target specificity from the mesophilic bacterium *Kurthia massiliensis*. *Nucleic Acids Res.* 49: 4054-4065.

2. Oguienko A, Petushkov I, Pupov D, Esyunina D, Kulbachinskiy A. 2021. Universal functions of the σ finger in alternative σ factors during transcription initiation by bacterial RNA polymerase. *RNA Biol.* 18: 2028-2037.
3. Shin Y, Qayyum MZ, Pupov D, Esyunina D, Kulbachinskiy A, Murakami KS. 2021. Structural basis of ribosomal RNA transcription regulation. *Nat Commun.* 12: 528.
4. Lisitskaya L., Petushkov I., Esyunina D., Aravin A., Kulbachinskiy A. 2020. Recognition of double-stranded DNA by the *Rhodobacter sphaeroides* Argonaute protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 533:1484-1489.
5. Pletnev P, Pupov D, Pshanichnaya L, Esyunina D, Petushkov I, Nesterchuk M, Osterman I, Rubtsova M, Mardanov A, Ravin N, Sergiev P, Kulbachinskiy A, Dontsova O. 2020. Rewiring of growth-dependent transcription regulation by a point mutation in region 1.1 of the housekeeping σ factor. *Nucleic Acids Research* 48: 10802-10819.
6. Kuzmenko A, Oguienko A, Esyunina D, Yudin D, Petrova M, Kudinova A, Maslova O, Ninova M, Ryazansky S, Leach D, Aravin AA, Kulbachinskiy A. 2020. DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease. *Nature* 587: 632-637.
7. Петушков И.В., Кульбачинский А.В. 2020. Роль контактов Cre-района РНК-полимеразы *Escherichia coli* с нематричной цепью ДНК в процессе ухода с промотора. *Биохимия* 85: 929-939.
8. Agapov A., Ignatov A., Turtola M., Belogurov G., Esyunina D., Kulbachinskiy A. 2020. Role of the trigger loop in translesion RNA synthesis by bacterial RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 295: 9583-9595.
9. Prostova M., Kulbachinskiy A., Esyunina D. 2020. Antitermination protein P7 of bacteriophage Xp10 distinguishes different types of transcriptional pausing by bacterial RNA polymerase *Biochimie* 170: 57-64.
10. Agapov A., Kulbachinskiy A. 2020. Four paralogous Gfh factors in the extremophilic bacterium *Deinococcus peraridilitoris* have distinct effects on various steps of transcription. *Biochimie* 170: 21-25.
11. Miropolskaya N., Kulbachinskiy A., Esyunina D. 2020. Factor-specific effects of mutations in the active site of RNA polymerase on RNA cleavage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 523: 165-170.
12. Mindlin S., Beletsky A., Rakitin A., Mardanov A., Petrova M. *Acinetobacter* plasmids: diversity and Development of classification strategies. *Front Microbiol.*, 2020, 11: 588410.
13. Mindlin S., Maslova O., Beletsky A., Nurmukanova V., Zong Z., Mardanov A., Petrova M. Ubiquitous Conjugative Mega-Plasmids of

Acinetobacter Species and Their Role in Horizontal Transfer of Multi-Drug Resistance. *Front Microbiol.* 2021, 12: 728644.

14. Rakitin A., Ermakova A., Beletsky A., Petrova M., Mardanov A., Ravin N. Genome Analysis of *Acinetobacter lwoffii* Strains Isolated from Permafrost Soils Aged from 15 Thousand to 1.8 Million Years Revealed Their Close Relationships with Present-Day Environmental and Clinical Isolates. *Biology (Basel)*, 2021, 10(9): 871.

15. Kudinova A., Dolgih A., Mergelov N., Shorkunov I., Maslova O., Petrova M. The Abundance and Taxonomic Diversity of Filterable Forms of Bacteria during Succession in the Soils of Antarctica (Bunger Hills). *Microorganisms*, 2021, 9(8):1728.

16. А. Г. Кудинова, М. А. Петрова, А. В. Долгих, В. С. Соина, Л. В. Лысак, О. А. Маслова. Таксономическое разнообразие бактерий и их фильтрующихся форм в почвах Восточной Антарктиды (оазисы Холмы Ларсеманн и Холмы Бангера). *Микробиология*, 2020, 89(5): 581–592.

СВОЙСТВА БЕЛКОВ-АРГОНАВТОВ ПРОКАРИОТ ИЗ НОВЫХ ГРУПП

к.б.н. Д.М. Есюнина

Лаборатория биологии РНК и эпигенетики

Основные исследования ЛБРИЭ в 2020-2021 году были сфокусированы на изучении бактериальных белков Аргонавтов. Данные белки, обнаруженные примерно в 10% геномах бактерий, весьма разнообразны по строению, наличию белков-партнеров и возможному механизму работы. Были проведены исследования ряда новых белков-Аргонавтов в системе *in vitro* и созданы системы для изучения данных белков *in vivo*.

В системах *in vitro* исследована специфичность связывания и разрезания ДНК и РНК, константы скорости реакции расщепления мишени, специфичность к 5'-концевому нуклеотиду гена, влияние мисматчей в дуплексе гид-мишень на разрезание мишени, эффективность разрезания мишени в зависимости от каталитических ионов металлов и температуры реакции.

В то время как эукариотические Аргонавты используют РНК-гид для узнавания РНК-мишени, бактериальные Аргонавты могут также использовать ДНК в качестве, как гена, так и мишени, однако зачастую

каталитическая активность проявляется только в одном из 4 возможных сочетаний РНК и ДНК субстратов в качестве мишени и гида. Большинство исследуемых бактериальных Аргонавтов – ДНК-зависимые ДНК-нуклеазы. Для этой группы белков проведено изучение ДНК-интерференции и факторов, влияющих на эффективность данного процесса.

В ходе работы удалось обнаружить новые группы белков, разрезающие РНК-мишень с помощью ДНК-гида и наоборот. Было показано, что в новой группе Аргонавтов имеется уникальный MID-домен, в котором за счет отсутствия специфического кармана для 5'-нуклеотида гидовая молекула ДНК связывается со сдвигом на 1 нуклеотид относительно всех известных структур (структурные данные получены лабораторией К. Мураками), что приводит к смещению на 1 нуклеотид позиции разрезания мишени. Также продемонстрировано, что наличие некоторых модификаций в РНК-мишени в месте разрезания ингибирует ее процессинг. Это может быть использовано в дальнейшем для определения модификаций в РНК.

Был исследован белок-Аргонавт, способный разрезать ДНК- и РНК-мишени с помощью ДНК- и РНК-гидов. Продемонстрировано, что расщепляющие РНК-мишень Аргонавты могут успешно использоваться для анализа вторичной структуры РНК.

В целом проведенные исследования являются основой для понимания разнообразия механизмов работы и функций бактериальных Аргонавтов и могут найти применение в различных областях молекулярной биологии и биотехнологии.

Публикации Лаборатории биологии РНК и эпигенетики:

1. Kropocheva E, Kuzmenko A, Aravin AA, Esyunina D, Kulbachinskiy A. 2021. A programmable pAgo nuclease with universal guide and target specificity from the mesophilic bacterium *Kurthia massiliensis*. *Nucleic Acids Res.* 49(7): 4054-4065. doi: 10.1093/nar/gkab182.
2. Oguienko A, Petushkov I, Pupov D, Esyunina D, Kulbachinskiy A. 2021. Universal functions of the sigma finger in alternative sigma factors during transcription initiation by bacterial RNA polymerase. *RNA Biol.* 18(11):2028-2037. doi: 10.1080/15476286.2021.1889254.

3. Shin Y, Qayyum MZ, Pupov D, Esyunina D, Kulbachinskiy A, Murakami KS. 2021. Structural basis of ribosomal RNA transcription regulation. *Nat Commun.* 12(1): 528. doi: 10.1038/s41467-020-20776-y.
4. Lisitskaya L., Petushkov I., Esyunina D., Aravin A., Kulbachinskiy A. 2020. Recognition of double-stranded DNA by the *Rhodobacter sphaeroides* Argonaute protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 533(4):1484-1489. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.10.051
5. Pletnev P, Pupov D, Pshanichnaya L, Esyunina D, Petushkov I, Nesterchuk M, Osterman I, Rubtsova M, Mardanov A, Ravin N, Sergiev P, Kulbachinskiy A, Dontsova O. 2020. Rewiring of growth-dependent transcription regulation by a point mutation in region 1.1 of the housekeeping σ factor. *Nucleic Acids Research* 48(19): 10802-10819. doi: 10.1093/nar/gkaa798.
6. Kuzmenko A, Oguienko A, Esyunina D, Yudin D, Petrova M, Kudinova A, Maslova O, Ninova M, Ryazansky S, Leach D, Aravin AA (2 аффиляции), Kulbachinskiy A. 2020. DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease. *Nature* 587 (7835): 632-637. doi: 10.1038/s41586-020-2605-1.
7. Agapov A., Ignatov A., Turtola M., Belogurov G., Esyunina D., Kulbachinskiy A. 2020. Role of the trigger loop in translesion RNA synthesis by bacterial RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 295(28):9583-9595. doi: 10.1074/jbc.RA119.011844.
8. Olina A., Kuzmenko A., Ninova M., Aravin A.A., Kulbachinskiy A., Esyunina D. 2020. Genome-wide DNA sampling by Ago nuclease from the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *RNA Biol.* 17(5): 677-688. doi: 10.1080/15476286.2020.1724716.
9. Prostova M., Kulbachinskiy A., Esyunina D. 2020. Antitermination protein P7 of bacteriophage Xp10 distinguishes different types of transcriptional pausing by bacterial RNA polymerase *Biochimie* 170:57-64. doi: 10.1016/j.biochi.2019.12.011.
10. Agapov A., Kulbachinskiy A. 2020. Four paralogous Gfh factors in the extremophilic bacterium *Deinococcus peraridilitoris* have distinct effects on various steps of transcription. *Biochimie* 170:21-25. doi: 10.1016/j.biochi.2019.12.006.
11. Miropolskaya N, Kulbachinskiy A, Esyunina D. Factor-specific effects of mutations in the active site of RNA polymerase on RNA cleavage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 523(1):165-170. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.12.045.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПРИРОДА НАРУШЕНИЙ РАЗВИТИЯ ПРИ ДИСФУНКЦИИ ТЕЛОМЕР У *DROSOPHILA*

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. Наиболее важные этапы регуляции теломер во время нормального развития происходят в зародышевой линии, чтобы обеспечить потомству наследование стабильного генома и предотвратить возникновение хромосомных аномалий. Исследование гомеостаза теломер в ходе нормального развития является актуальной задачей и может решаться с помощью модельных организмов благодаря высокой консервативности биологии теломер. Мы проводим систематическое исследование факторов регуляции теломер в герминальных тканях *Drosophila melanogaster*. РНК-связывающий белок *Ars2* является одним из консервативных теломерных факторов, регулирующих транскрипцию теломер. Нокдаун *Ars2* у дрозофилы приводит к теломер-специфичному эффекту - гиперэкспрессии только теломерных повторов. Эта генетическая система очень привлекательна для исследования «сигнальной» роли теломерных РНК при дисфункции теломер. Считается, что механизмы теломерного сигналинга, природа которых только начинает исследоваться, вызывают остановку клеточных делений в случае возникновения теломерной дисфункции. Дисфункция теломер *Drosophila*, вызванная различными генетическими факторами, в том числе и *Ars2*, приводит к нарушениям оогенеза и ранней эмбриональной гибели. При этом, как правило, усиливается транскрипция теломерных повторов, поэтому образующиеся теломерные РНК могут рассматриваться, как сигналы теломерной дисфункции. Масс-спектрометрический анализ белков, взаимодействующих с рибонуклеопротеиновыми частицами, состоящими из РНК и белка, кодируемого теломерным ретроэлементом HeT-A дрозофилы, выявил киназы Polo и Cdk1, которые являются ключевыми регуляторами клеточного цикла. Это взаимодействие нарушает динамику и локализацию киназ Polo и Cdk1 в процессе оогенеза и раннего развития. Кроме того, теломерная дисфункция в яичниках дрозофилы вызывает нарушение сборки и

наследования материнских центросом в процессе оогенеза, что, по-видимому, является причиной ранней остановки развития. Предполагается, что данный механизм можно рассматривать, как проявление теломерного сигналинга, направленного на сохранение целостности генома в развитии. Белки-партнеры теломерных РНП, участвующие в этом процессе, могут послужить новыми диагностическими или терапевтическими мишенями.

Публикации Лаборатории исследования геномных повторов эукариот:

1. 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.* 2020, 48(1):141-156. doi: 10.1093/nar/gkz1072. Q1
2. P.A. Komarov, O. Sokolova, N. Akulenko, E. Brasslet, S. Jensen* and A. Kalmykova Epigenetic Requirements for Triggering Heterochromatinization and Piwi-Interacting RNA Production from Transgenes in the Drosophila Germline. *Cells* 2020, 9(4), 922. doi: 10.3390/cells9040922. Q1
3. V. Morgunova, M. Kordyukova, E.A. Mikhaleva, I. Butenko, O.V. Pobeguts, and A. Kalmykova. Loss of telomere silencing is accompanied by dysfunction of Polo kinase and centrosomes during Drosophila oogenesis and early development. *PlosOne* 2021, 16(10): e0258156. Q1

**ПОИСК И ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА,
ОРТОЛОГИ КОТОРЫХ ЗАДЕЙСТВОВАНЫ В РЕАКЦИЮ
НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНУЮ ИШЕМИЮ МОЗГА
В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ**

А.В. Хрунин, Г.В. Хворых, С.А. Лимборская

Лаборатория молекулярной генетики человека
Отдела молекулярных основ генетики человека (ОМОГЧ)

Несмотря на значительный прогресс в понимании генетических основ ишемического инсульта (ИИ), многие его аспекты остаются малоизученными. К ним относятся генетика исходов инсульта, а также проблемы с идентификацией настоящих причинных локусов и их функциональных аннотаций. В качестве одной из возможностей на

пути углубления нашего понимания молекулярно-генетических основ патофизиологии инсульта рассматривается перенос результатов, полученных на моделях животных, на человека. Для этого нами был разработан биоинформатический подход по отбору генов кандидатов и маркерных локусов, основанный на анализе однонуклеотидного полиморфизма (SNPs) в человеческих ортологах генов крыс, дифференциально экспрессирующихся в условиях индуцированной ишемии мозга. Он включал несколько последовательных этапов. 1. Отбор крысиных генов, продемонстрировавших наиболее значительные изменения экспрессии в головном мозге в ответ на окклюзию правой средней мозговой артерии. 2. Идентификация человеческих ортологов отобранных крысиных генов. 3. Идентификация SNPs внутри генов человека и выявления среди них локусов с высокой степенью неравновесия по сцеплению с другими полиморфизмами (tagSNPs). Для этого требуются данные о последовательностях всего генома из подходящей популяции (в нашем исследовании это была популяция CEU из проекта 1000 геномов). 4. Аннотирование и идентификация функционально важных tagSNPs, ассоциированных с количественными изменениями в экспрессии исследуемых генов (expression quantitative trait loci; eQTL). Функциональная оценка tagSNPs проводилась с помощью баз данных международного проекта The Genotype-Tissue Expression project. Используя представленный подход, мы проанализировали полиморфизм 86 генов человека, часть из которых была генотипирована в группах больных с ИИ и здоровых лиц (контроля). Мы исследовали связь SNPs как с функциональным статусом больных (исходами инсульта), так и с риском самого заболевания. SNP rs66782529 (*LGALS3*) был ассоциирован с негативной динамикой функционального состояния больных после ИИ ($p = 0,048$). SNPs rs62278647 и rs2316710 (*PTX3*) были достоверно связаны с риском ИИ ($p = 0,000029$ и $p = 0,0025$, соответственно). Интересно, что эти корреляции для rs62278647 и rs2316710 были обнаружены только у женщин, что может свидетельствовать о специфической ассоциации полиморфизма *PTX3* с полом. В целом, проведенные исследования, не только позволили выявить некоторые новые генетические ассоциации с ИИ и его результатами, но также продемонстрировали, как изучение вариаций генов на животной модели ишемии мозга может быть полезно для поиска генетических маркеров этого заболевания у человека.

ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМНОГО ОТВЕТА ГЕНОМА КЛЕТОК МОЗГА НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДОВ В НОРМЕ, ПРИ ОСТРОМ СТРЕССЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Л.В. Дергунова, И.Б. Филиппенков, С.А. Лимборская
Лаборатория функциональной геномики ОМОГЧ

В настоящее время все большее значение придается разработке лекарственных средств на основе естественных регуляторных пептидов. Их преимущество связано с мягкостью действия и отсутствием побочных эффектов. Большинство из них, в отличие от других лекарств, не имеет в организме четко обозначенной молекулярной мишени действия. Они обладают множественным действием, оказывая влияние одновременно на различные группы рецепторов. Большой вклад в изучение особенностей действия пептидных препаратов вносит метод полногеномного секвенирования РНК (RNA-Seq). Особое внимание уделяется пептидным препаратам, которые способствуют восстановлению мозговых функций после таких патологических состояний, как стресс и острое нарушение мозгового кровообращения (инсульт). С использованием метода RNA-Seq нами выяснены особенности воздействия пептидов, обладающих нейротропными и антистрессорными свойствами, на транскриптом в отделах мозга крыс, находящихся в нормальных физиологических условиях, при экспериментальной ишемии и остром стрессе. Работа проводилась совместно с Отделом химии физиологически активных веществ.

Для исследования транскрипционной активности клеток мозга крыс под действием АКТГ (6-9)PGP, АКТГ(4-7)PGP (семакс) и селанка отработана модель церебральной ишемии мозга крыс (tMCAO). Выявлены гены, дифференциально экспрессирующиеся в участках лобной коры крыс, включающих зону пенумбры, спустя 4.5 и 24 ч после обратимой окклюзии правой средней мозговой артерии при введении пептидов. Обнаружены гены и связанные с ними сигнальные пути, как общие для анализируемых пептидов, так и специфичные для каждого из них. Установлен компенсаторный эффект семакса и АКТГ(6-9)PGP на транскрипционную активность генов воспаления и иммунного ответа, нарушенную действием ишемии. Морфофункциональные и иммуногистохимические исследования эффективности АКТГ(6-9)PGP и семакса показали, что пептиды

снижают выраженность ишемического повреждения нейронов, способствуют увеличению пролиферативной активности нейроглии с последующим восстановлением морфологии нейронов и активации коллатерального кровотока в перинфарктных зонах мозга.

Изучен транскриптомный ответ клеток мозга на действие нейропротекторных пептидов семакса и селанка у лабораторных животных, подвергнутых стрессогенному воздействию. Обнаружены гены, дифференциально экспрессирующиеся в гиппокампе крыс в условиях острого стресса при введении селанка и семакса, участвующие в антистрессорном эффекте пептидов. С помощью методов кластеризации и функционального аннотирования с применением программ gProfiler и GSEA определены сигнальные пути и метаболические системы, участвующие в работе генов, обеспечивающих антистрессорный эффект семакса и селанка. Компенсаторный эффект обоих пептидов на активность генома направлен преимущественно на систему нейросигнализации и синаптической регуляции.

**Публикации Отдела молекулярных основ
генетики человека:**

1. Khrunin AV, Khvorykh GV, Fedorov AN, Limborska SA. Genomic landscape of the signals of positive natural selection in populations of Northern Eurasia: A view from Northern Russia. PLoS One. 2020;15(2):e0228778.
2. Dergunova LV, Nosova EV, Dmitrieva VG, Rozhkova AV, Bazaeva EV, Limborska SA, Dergunov AD. HDL cholesterol is associated with PBMC expression of genes involved in HDL metabolism and atherogenesis. J Med Biochem. 2020;39(3): 372-383.
3. Kamitaki N, Sekar A, Handsaker RE, de Rivera H, Tooley K, Morris DL, Taylor KE, Whelan CW, Tomblason P, Loohuis LMO;...Limborska SA,...Khrunin AV, Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Boehnke M, Kimberly RP, Kaufman KM, Harley JB, Langefeld CD, Seidman CE, Pato MT, Pato CN, Ophoff RA, Graham RR, Criswell LA, Vyse TJ, McCarroll SA. Complement genes contribute sex-biased vulnerability in diverse disorders. Nature. 2020;582(7813):577-581.
4. Khvorykh GV, Mulyar OA, Fedorova L, Khrunin AV, Limborska SA, Fedorov A. Global Picture of Genetic Relatedness and the Evolution of Humankind. Biology (Basel). 2020;9(11):392.

5. Filippenkov IB, Stavchansky VV, Denisova AE, Yuzhakov VV, Sevan'kaeva LE, Sudarkina OYu, Dmitrieva VG, Gubsky LV, Myasoedov NF, Limborska SA, Dergunova LV. Novel Insights into the Protective Properties of ACTH(4-7)PGP (Semax) Peptide at the Transcriptome Level Following Cerebral Ischaemia–Reperfusion in Rats. *Genes*. 2020;11(6), 681.
6. Филиппенков И.Б., Дергунова Л.В., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф. Нейропротективные эффекты пептидов в мозге: транскриптомные подходы к их исследованию (Пептидная регуляция мозга). *Биохимия*. 2020, том 85, вып. 3, с. 324 – 334
7. Filippenkov IB, Dergunova LV, Limborska SA. The Role of Noncoding RNAs in Brain Cells during Rat Cerebral Ischemia. 2020, Chapter in the book «Non-Coding RNAs» ISBN 978-1-78985-656-9, OpenIntech, pp 83-98.
8. Khvorykh GV, Khrunin AV. imputeqc: an R package for assessing imputation quality of genotypes and optimizing imputation parameters. *BMC Bioinformatics*. 2020 Jul 24;21(Suppl 12):304.
9. Филиппенков И.Б., Дергунова Л.В. // Роль кодирующих и регуляторных РНК при остром стрессе. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2020;38(3):103–107.
10. Dergunov AD, Litvinov DY, Malkov AA, Baserova VB, Nosova EV, Dergunova LV. // Denaturation of human plasma high-density lipoproteins by urea studied by apolipoprotein A-I dissociation.// *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2021 Jan;1866(1):158814.
11. Khrunin AV, Khvorykh GV, Rozhkova AV, Koltsova EA, Petrova EA, Kimelfeld EI, Limborska SA. Examination of Genetic Variants Revealed from a Rat Model of Brain Ischemia in Patients with Ischemic Stroke: A Pilot Study. *Genes (Basel)*. 2021 Nov 30;12(12):1938.
12. Rozhkova A.V., Dmitrieva V.G., Nosova E.V., Dergunov A.D., Limborska S.A., Dergunova L.V. // Genomic Variants and Multilevel Regulation of ABCA1, ABCG1, and SCARB1 Expression in Atherogenesis // *J Cardiovasc Dev Dis*. 2021 Dec 2;8(12):170.
13. Dergunova LV, Filippenkov IB, Limborska SA, Myasoedov NF // Pharmacotranscriptomics of peptide drugs with neuroprotective properties // *Med Res Rev*. 2021 Mar;41(2):754-769.
14. Filippenkov IB, Stavchansky VV, Glazova NY, Sebentsova EA, Remizova JA, Valieva LV, Levitskaya NG, Myasoedov NF, Limborska SA, Dergunova LV. Antistress Action of Melanocortin Derivatives Associated with Correction of Gene Expression Patterns in the Hippocampus of Male Rats Following Acute Stress. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 17;22(18):10054.

15. Sudarkina OY, Filippenkov IB, Stavchansky VV, Denisova AE, Yuzhakov VV, Sevan'kaeva LE, Valieva LV, Remizova JA, Dmitrieva VG, Gubsky LV, Myasoedov NF, Limborska SA, Dergunova LV. Brain Protein Expression Profile Confirms the Protective Effect of the ACTH(4–7)PGP Peptide (Semax) in a Rat Model of Cerebral Ischemia–Reperfusion. // *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 8;22(12):6179.
16. Filippenkov IB, Stavchansky VV, Denisova AE, Valieva LV, Remizova JA, Mozgovoy IV, Zaytceva EI, Gubsky LV, Limborska SA, Dergunova LV // Genome-Wide RNA-Sequencing Reveals Massive Circular RNA Expression Changes of the Neurotransmission Genes in the Rat Brain after Ischemia–Reperfusion // *Genes (Basel)*. 2021 Nov 24;12(12):1870.
17. Khvorykh G, Khrunin A, Filippenkov I, Stavchansky V, Dergunova L, Limborska S // A Workflow for Selection of Single Nucleotide Polymorphic Markers for Studying of Genetics of Ischemic Stroke Outcomes // *Genes (Basel)*. 2021 Feb 25;12(3):328.
18. Ni G, Zeng J, Revez JA, Wang Y, Zheng Z, Ge T, Restuadi R, Kiewa J, Nyholt DR, Coleman JRI, Smoller JW; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium; Ripke S... Khrunin A, ... Limborska S, ..., Pedersen NL, ... Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Yang J, Visscher PM, Wray NR // A Comparison of Ten Polygenic Score Methods for Psychiatric Disorders Applied Across Multiple Cohorts// *Biol Psychiatry*. 2021 Nov 1;90(9):611-620.
19. Blokland GAM, Grove J, Chen CY, Cotsapas C, Tobet S, Handa R; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Ripke S... Khrunin A, ... Limborska S, ..., Geschwind D, ... Goldstein JM. Sex-Dependent Shared and Nonshared Genetic Architecture Across Mood and Psychotic Disorders. *Biol Psychiatry*. 2021 Mar 23:S0006-3223(21)01139-2.
20. Hess JL, Tylee DS, Mattheisen M, ... Khrunin A, ... Limborska S, ... Edenberg HJ, Holmans P, Faraone SV, Glatt SJ. A polygenic resilience score moderates the genetic risk for schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2021 Mar;26(3):800-815.
21. Дергунова Л.В., Дмитриева В.Г., Филиппенков И.Б., Ставчанский В.В., Денисова А.Е., Южаков В.В., Севаньякаева Л.Е., Валиева Л.В., Сударкина О.Ю., Губский Л.В., Мясоедов Н.Ф., Лимборская С.А. // Выявление подавляющего действия пептидного препарата АКТГ(4–7)PGP (семакс) на повышенную активность генов провоспалительных медиаторов в условиях обратимой ишемии мозга крыс // *Молекулярная биология*, 2021, том 55, № 3, с. 402–411.

22. Ignatov DI, Khvorykh GV, Khrunin AV, Nikolić S, Shaban M, Petrova EA, Koltsova EA, Takelait F, Egunov D. (2021) Object-Attribute Biclustering for Elimination of Missing Genotypes in Ischemic Stroke Genome-Wide Data. In: van der Aalst W.M.P. et al. (eds) Recent Trends in Analysis of Images, Social Networks and Texts. AIST 2020. Communications in Computer and Information Science, vol 1357, pp. 185-204.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ПРИРОДНЫХ ПЕПТИДОВ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ОПТИМИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ КАНДИДАТНЫХ ПЕПТИДОВ, РАЗРАБОТКА СХЕМ СИНТЕЗА, ВКЛЮЧАЯ ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ДЕЙТЕРИЕМ И ТРИТИЕМ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Академик Н.Ф. Мясоедов

Лаборатория молекулярной фармакологии пептидов

За отчетный период разработаны оптимальные схемы синтеза, проведен синтез и наработка наиболее перспективных соединений для изучения их биологической, физиологической, цитотоксической, фармакологической активности и механизма действия, как основы для создания новых лекарственных препаратов.

В результате проведенных исследований впервые показано, что пептиды глипролинового ряда, содержащие в своей структуре лизин, лейцин и аргинин, при многократном введении обладали уникальным сочетанным действием. Впервые полученные результаты указывают на потенциальные возможности пептидных соединений, включающих аргинин, лейцин и лизин, влиять на гомеостатические процессы, изменять метаболизм органов и тканей и участвовать в регуляции обмена веществ, поддерживать метаболический и гемостазиологический баланс организма. Это свидетельствует о перспективности использования препаратов на основе регуляторных пептидов в качестве терапевтических средств защиты организма. Исследования проведены совместно с Биологическим факультетом МГУ им. М.В. Ломоносова

Исследовано влияние пептидов на транскриптом в норме и при различных патологиях. В качестве патологий рассматривался ишемический инсульт и стресс. Выявлены гены, реагирующие на патологию, а также на введение пептидов в норме и при патологии.

Исследования проведены совместно с Отделом молекулярной генетики человека.

Изучено влияние биологически активных соединений на функционирование различных рецепторных систем головного мозга млекопитающих в норме и в условиях патологии. Проведено исследование острых и отставленных эффектов негативных перинатальных воздействий различной природы. Впервые выявлены изменения социального поведения и когнитивных функций у самцов и самок белых крыс, перенесших неонатальную гипоксию или подвергавшихся воздействию антидепрессанта флувоксамина на разных этапах развития. Впервые проведенные исследования подтверждают роль негативных перинатальных воздействий в развитии аномалий поведения, присущим аутистическим расстройствам.

Оценена перспективность пролиновых производных доксорубина, дофамина и серотонина для дальнейшей разработки в качестве кандидата в лекарственные препараты путем оценки их проницаемости через искусственные мембраны. Впервые синтезирован фосфиновый псевдопролилглицилпролин и изучены его свойства. Разработаны методы введения изотопов водорода в органические вещества. Отработаны методы препаративного синтеза дейтерированных аналогов биологически активных соединений. Исследованы ранее не известные пути деградации абсцизовой кислоты, которая является важным звеном для запуска адаптивных изменений растений, происходящих под влиянием абиотических стрессовых факторов.

Впервые создан поведенческий тест для исследования фармакодинамики нейропротекторных препаратов для лечения болезни Паркинсона (БП). Проведено исследование влияния пептида H-Thr-Gly-Glu-Asn-His-Arg-NH₂ на восстановление нигростриатной дофаминергической системы на МФТП-модели БП. Проведено исследование влияния пептида H-Thr-Gly-Glu-Asn-His-Arg-NH₂ на преодоление дисфункций, обусловленных старением, у крыс. Установлено, что этот пептид способен преодолевать изменения в организме, вызванные старением.

В рамках исследования потенциального гипотензивного действия глипролинов проведено тестирование ингибиторной активности ряда пептидов этой группы в отношении ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) быка. В результате проведенных исследований

выявлен и частично охарактеризован новый пептидный ингибитор АПФ.

При выполнении работ в 2020-2021 годах впервые получены важные научные соответствующие мировому уровню результаты, обладающие новизной. Полученные результаты обобщены в публикациях и представлены на научных мероприятиях различного уровня. Все полученные результаты исследований служат фундаментальной основой для продолжения дальнейших работ, с целью создания в перспективе на их основе новых лекарственных препаратов.

Публикации Лаборатории молекулярной фармакологии пептидов (зарубежные):

1. Kulikova O.I., Stvolinsky S.L., Migulin V.A., Andreeva L.A., Nagaev I.Y., Lopacheva O.V., Kulichenkova K.N., Lopachev A.V., Trubitsina I.E., Fedorova T.N. A new derivative of acetylsalicylic acid and carnosine: synthesis, physical and chemical properties, biological activity //2020, DARU-JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 28, 1, 119-130, JUN 2020, DOI: 10.1007/s40199-019-00323-x, WOS:000505417000001, PubMed: 31902097
2. Vyunova T.V., Andreeva L.A., Shevchenko K.V., Grigoriev V.V., Palyulin V.A., Lavrov M.I., Bondarenko E.V., Kalashnikova E.E., Myasoedov N.F. Characterization of a new positive allosteric modulator of AMPA receptors - PAM-43: specific binding of the ligand and its ability to potentiate AMPAR currents//2020, Current Molecular Pharmacology, Mar 3. V. 13, ISSUE: 3, P. 216 - 223, doi:10.2174/1874467213666200303140834, PMID: 32124706
3. Filippenkov I.B., Stavchansky V.V., Denisova A.E., Yuzhakov V.V., Sevan'kaeva L.E., Sudarkina O.Y., Dmitrieva V.G., Gubsky L.V., Myasoedov N.F., Limborska S.A., Dergunova L.V. Novel Insights into the Protective Properties of ACTH(4-7)PGP (Semax) Peptide at the Transcriptome Level Following Cerebral Ischaemia–Reperfusion in Rats// 2020, Genes, 11, 681; doi:10.3390/genes11060681, 2-17, Received: 16 May 2020; Accepted: 18 June 2020; Published: 22 June 2020
4. Serebrovskaya E.O., Podvalnaya N.M., Dudenkova V.V., Efremova A.S., Gurskaya N.G., Gorbachev D.A., Luzhin A.V., Kantidze O.L., Zagaynova E.V., Shram S.I., Lukyanov K.A. Genetically Encoded Fluorescent Sensor for Poly-ADP-Ribose// 2020, Int. J. Mol. Sci., V.21. N14. P.5004-5014, doi: 10.3390/ijms21145004

5. Yasenyavskaya A.L., Samotrueva M.A., Tsbizova A.A., Bashkina O.A., Myasoedov N.F., Andreeva L.A. The Influence of Selank on the Level of Cytokines Under the Conditions of «Social» Stress. *Current Reviews in Clinical and Experimental Pharmacology* //2021, Jul 4. Volume 16, 2, 162-167, DOI: 10.2174/1574884715666200704152810, PMID: 32621722
6. Glazova Nataliya Yu., Manchenko Daria M., Volodina Maria A., Merchieva Svetlana A., Andreeva Ludmila A., Kudrin Vladimir S., Myasoedov Nikolai F., Levitskaya Natalia G. Semax, synthetic ACTH(4–10) analogue, attenuates behavioural and neurochemical alterations following early-life fluvoxamine exposure in white rats// 2021, *Neuropeptides* 86, № статьи 102114, PMID: 33418449, <https://doi.org/10.1016/j.npep.2020.102114>
7. Vinyukov A.V., Dmitriev M.E., Andreeva L.A., Ustyugov A.A., Shevchenko V.P., Sidoruk K.N., Lednev B.V., Freyman V.M., Dobrovolskiy Yu.A., Ragulin V.V., Myasoedov N.F. Phosphine modification of proline-glycine-proline tripeptide and study of its neuroprotective properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*//2021, V.539. P.15-19. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.12.087>
8. Akimov M.G., Fomina-Ageeva E.V., Dudina P.V., Andreeva L.A., Myasoedov N.F., Bezuglov V.V. ACTH(6–9)PGP Peptide Protects SH-SY5Y Cells from H₂O₂, tert-Butyl Hydroperoxide, and Cyanide Cytotoxicity via Stimulation of Proliferation and Induction of Prosurvival-Related Genes//2021, *Molecules*, V. 26, N 7, № статьи 1878, <https://doi.org/10.3390/molecules26071878>, опубликовано в APR 2021, WOS:000638730700001, PubMed: 33810344
9. Dergunova L. V., Filippenkov, I.B., Limborska S.A., Myasoedov N.F. Pharmacotranscriptomics of peptide drugs with neuroprotective properties//2021, *Medicinal Research Reviews*, Mar;41(2):754-769. WOS:000545996200001, DOI: 10.1002/med.21704, PMID: 32638434, ранний доступ: JUL 2020
10. Myasoedov Nikolai F., Lyapina Lyudmila A., Andreeva Lyudmila A., Grigorieva Marina E., Obergan Tamara Y., Shubina Tatiana A. The modern view on the role of glyprolines by metabolic syndrome//2021, *Medicinal Research Reviews*, First Published: 5 November 2020, <https://doi.org/10.1002/med.21748>, 2020, 41, 5, 2843-2840, Специальный выпуск: SI, Ранний доступ: NOV 2020, Опубликовано: SEP 2021, WOS:000585815200001, PubMed: 33155318

11. Sokolov O.Yu., Prokhorova T.A., Tereshkina E.B., Zozulya S.A., Simonov A.N., Kost N.V., Dadayan A.K., Bogachouk A.P. , Zolotarev Yu.A. Neurotropic peptide HLDf-6-amide reduces age-related decline in sexual activity in old male rats//2021, *Experimental Gerontology*, v. 149, 1 July 2021, 111329, 1-4, www.elsevier.com/locate/expgero, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111329>
12. Yuzikhin O.S., Gogoleva N. E., Shaposhnikov A. I., Konnova T.A., Osipova E.V., Syrova D.S., Ermakova E.A., Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Shevchenko K.V., Myasoedov N. F., Safronova V.I., Shavarda A.L., Nizhnikov A.A., Belimov A.A., Gogolev Yu.V. Rhizosphere Bacterium *Rhodococcus* sp. P1Y Metabolizes Abscisic Acid to form Dehydrovomifoliol //2021, *Biomolecules*, 11,3,1-16, <https://doi.org/10.3390/biom11030345>
13. Sudarkina O.Yu., Filippenkov I.B., Stavchansky V.V., Denisova A.E., Yuzhakov V.V., Sevan'kaeva L.E., Valieva L.V., Remizova Ju.A., Dmitrieva V.G., Gubsky L.V., Myasoedov N.F., Limborska S.A., Dergunova L.V. Brain Protein Expression Profile Confirms the Protective Effect of the ACTH(4–7)PGP Peptide (Semax) in a Rat Model of Cerebral Ischemia–Reperfusion// 2021, *Int. J. Mol. Sci.*, 22(12), 6179, <https://doi.org/10.3390/ijms22126179>
14. Filippenkov I.B., Stavchansky V.V., Glazova N.Yu. , Sebentsova E.A., Remizova Ju.A., Valieva L.V., Levitskaya N.G., Myasoedov N.F., Limborska S.A., Dergunova L.V. Antistress Action of Melanocortin Derivatives Associated with Correction of Gene Expression Patterns in the Hippocampus of Male Rats Following Acute Stress// 2021, *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 10054, <https://doi.org/10.3390/ijms221810054>
15. Zolotarev Yu.A, Mitkevich V.A., Shram S.I., Adzhubei A.A., Tolstova A.P., Talibov O.B., Dadayan A.K., Myasoyedov N.F., Makarov A.A., Kozin S.A. Pharmacokinetics and Molecular Modeling Indicate nAChR α 4-Derived Peptide HAEE Goes through the Blood–Brain Barrier//2021, *Biomolecules*, 11(6), № статьи 909; <https://doi.org/10.3390/biom11060909>, WOS:000665580700001, PubMed: 34207317
16. Malyshev A.V., Sukhanova I.A., Zlobin A.S., Gedzun V.R., Pavshintsev V.V., Vasileva E.V., Zalevsky A.O., Doronin I.I., Mitkin N.A., Golovin A.V., Lovat M.L., Kovalev G.I., Zolotarev Yu.A., Kuchumov A.R., Babkin G.A., Luscher B. In silico screening and behavioral validation of a novel peptide, LCGA-17, with anxiolytic-like properties// 2021, *Frontiers in Neuroscience*, published: 02 August 2021. Номер статьи: 705590, doi: 10.3389/fnins.2021.705590, WOS:000687486900001, PubMed: 34421525
- 17.

В российских журналах - 47 статей
В иностранных журналах – 21 статья
Монографии - 2
Получено патентов российских - 1

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ БАКТЕРИЙ

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

Лаборатория регуляции экспрессии генов микроорганизмов

Основная тематика исследований Лаборатории в 2020 – 2021 годах включала следующие направления: 1) изучение биологической активности и механизмов действия летучих веществ, выделяемых микроорганизмами; 2) Quorum Sensing регуляция (QS) и ее роль в контроле клеточных процессов бактерий; 3) функциональная роль цианотоксина ВМАА в клетках цианобактерий. Кроме того, продолжались работы по изучению действия наночастиц на бактерии (совместно с сотрудниками Института химической физики РАН, рук. директор Института, д.х.н. Надточенко В.А.).

1. Биологическая активность и механизмы действия летучих веществ (ЛВ), образуемых микроорганизмами.

Известно, что микроорганизмы синтезируют огромное количество ЛВ, большую часть которых составляют летучие органические соединения (ЛОС) различной химической природы. База данных ЛОС, образуемых бактериями и грибами, включает уже больше 2000 идентифицированных ЛОС. В последние годы синтез ЛОС вызывает огромный интерес исследователей как новый, мало изученный аспект конкурентных отношений бактерий и их взаимодействия с высшими организмами. Действие ЛОС рассматривается сейчас как новый тип коммуникации бактерий - дистанционной коммуникации («infochemicals»). Кроме большого фундаментального значения, исследования ЛОС микроорганизмов могут обеспечить перспективы их использования на практике. Многочисленные ЛОС, образуемые микроорганизмами, 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, генетическая регуляция синтеза ЛОС изучены мало.

В 2020-2021 гг. нами были исследовано действие ЛВ и индивидуальных ЛОС, образуемых бактериями разных таксономических групп, на различные биологические объекты – фитопатогенные агробактерии, грибы, растения (на модели *A. thaliana*) и насекомых (*Drosophila melanogaster*). В работе были использованы ЛОС различных типов – кетоны (2-бутанон, 2-пентанон, 2-октанон, ненасыщенный кетон β -ионон), спирты (изоамиловый спирт, 2-фенилэтанол), терпены ((-)-лимонен, (+)- α -пинен). В основном, они оказывали подавляющее действие на исследованные объекты, зависящее от дозы ЛОС. Стимулирующее рост растений действие было показано для кетонов 2-бутанона и 2-пентанона. Продемонстрирована зависимость эффекта ЛВ от GacA-GacS системы регуляции бактерий.

В плане изучения механизмов действия ЛОС были проведены следующие работы. 1) С помощью транспозонов были получены мутанты цианобактерии *Synechococcus elongatus* PCC 7942, устойчивые к действию кетона 2-нонанона. Анализ мутантов показал, что 2-нонанон имеет различные мишени действия на эту бактерию. Среди них гены, участвующие в биогенезе и функционировании клеточной стенки бактерии, в ABC транспортной системе и гены, вовлеченные в ответ клеток на стрессовые воздействия. Показано, что мутанты, устойчивые к 2-нонанону, были резистентны также и к действию кетона 2-ундеканона. 2) С помощью специфических биосенсоров показано влияние ЛОС, выделяемых бактериями, на экспрессию с промоторов генов *copA*, *zntA* и *arsR*, отвечающих на стрессы, вызванные действием ионов тяжелых металлов (цинка, меди), а также мышьяка. При этом действие ЛОС было разнонаправленным и зависело от химической структуры ЛОС. При обработке культур биосенсоров кетонами 2-ундеканом, 2-нонаном, 2-гептаном и ДМДС экспрессия с промоторов генов *zntA* и *arsR* снижалась, а действие 2-пентанона увеличивало экспрессию *lux*-репортера с промоторов генов *copA* и *zntA*. 3) Исследован механизм действия двух циклических монотерпенов, (-)-лимонена и (+)- α -пинена, на бактерии. С использованием специфических биосенсоров было показано, что (-)-лимонен ингибирует рост бактерий *E. coli* в три стадии. На первой ранней стадии через 20-30 мин после его добавления к клеточной

суспензии в клетках образуется значительное количество активных форм кислорода - перекиси водорода и супероксид-анион-радикала, повреждающих ДНК, блокирующих репликацию и индуцирующих SOS-ответ. На второй стадии, через 30-50 мин, в клетке накапливаются поврежденные белки. На третьей, заключительной стадии, через 1-2 часа, происходит накопление повреждений клеточной мембраны, что приводит к повышению ее проницаемости и последующему разрушению. Эффект α -пинена был намного слабее. Кроме того, было показано, что (-)-лимонен полностью ингибирует рефолдинг термоинактивированных люцифераз, зависимый от шаперона DnaKJE-CipV в штамме *E. coli* дикого типа и $\Delta ibpV$ мутанте. (+)- α -Пинен частично ингибирует рефолдинг только в $\Delta ibpV$ мутанте.

2. Изучение Quorum Sensing регуляции, ее роли в контроле клеточных процессов бактерий. Взаимодействие QS и летучих соединений, выделяемых бактериями.

В 2020-2021 гг. были завершены работы по изучению QS систем бактерий *Serratia proteamaculans* (на примере штамма 94). В опубликованных статьях приводятся данные об организации генов QS системы SprI-SprR бактерии, участии генов синтазы, ответственной за синтез сигнальных молекул N-ацил-гомосеринлактонов (АГЛ) и гена, кодирующего регуляторный SprR белок, с которым взаимодействуют АГЛ, в регуляции клеточных процессов. *S. proteamaculans* является факультативным патогеном. Известно, что QS системы участвуют в регуляции вирулентности бактерий. В этом плане для бактерий вида *S. proteamaculans* практически ничего не было известно. В совместной работе с сотрудниками Института цитологии РАН исследовалась роль генов QS системы бактерии в инвазии *S. proteamaculans* 94, которая является одним из факторов вирулентности этой бактерии. В мутанте с нокаутом гена АГЛ синтазы *sprI* наблюдалось увеличение более чем в 4 раза инвазивной активности бактерии. Этот эффект коррелировал с увеличенной экспрессией гена белка внешней мембраны OmpX и уменьшением активности внутриклеточной протеазы протеализина, субстратом которой является белок OmpX. Полученные результаты показали, что QS система *S. proteamaculans* 94 участвует в регуляции инвазии этой бактерии.

Инактивация второго компонента QS системы *S. proteamaculans* 94, регуляторного рецепторного белка SprR также приводила к увеличению инвазии бактерий, но без увеличения экспрессии мембранного белка OmpX и уменьшения активности протеаз

протеализина. Однако, в этом случае наблюдалась корреляция увеличения инвазии с увеличенной активностью внеклеточной металлопротеазы серрализина. Таким образом, инактивация обоих белков QS системы ведет к увеличению инвазии *S. proteamaculans* 94 через независимые механизмы.

В настоящее время проводится работа по изучению действия различных типов ЛОС на QS регуляцию с использованием *lux*-биосенсоров, специфично реагирующих на различные АГЛ. Поиски соединений, подавляющих QS регуляцию, проводятся сейчас в большом количестве лабораторий в разных странах; их использование открывает новые возможности для борьбы с патогенными и фитопатогенными бактериями.

3. Функциональная роль цианотоксина ВМАА в клетках цианобактерий.

Цель нашего исследования – изучение функциональной роли цианотоксина ВМАА в метаболизме цианобактерий. Этот вопрос практически не изучен. Впервые проведено протеомное исследование действия цианотоксина – небелковой нейротоксической аминокислоты бета-N-метиламин-L-аланина (ВМАА) на ключевые биологические процессы, протекающие в клетках голодающей по азоту diaзотрофной цианобактерии *Nostoc sp.* PCC 7120. Выявлено регуляторное действие ВМАА на процессы клеточной дифференцировки, азотфиксации, фотосинтеза. ВМАА активирует в клетках цианобактерий окислительный стресс, что выявляется по увеличению экспрессии белков-шаперонов, ферментов, участвующих в защите от стресса, и белков репарационной системы ДНК. Полученные в работе научные результаты представляют большой интерес как для дальнейших фундаментальных исследований молекулярных механизмов регуляции клеточных процессов фотоавтотрофных бактерий, так и прикладной интерес для решения практических проблем регуляции разрастания цианобактериальных популяций, продуцирующих опасные для человека и животных токсины.

Публикации Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов:

1. Koksharova O.A., Popova A.A., Plyuta V.A., Khmel I.A. Four new genes of cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 are responsible for

- sensitivity to 2-nonanone. *Microorganisms*. 2020. V. 8, 1234. doi: 10.3390/microorganisms8081234. IF 4.167. Q2.
2. Плюта В.А., Сидорова Д.Е., Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Хмель И.А. Влияние летучих органических соединений, синтезируемых бактериями, на экспрессию с промоторов генов *zntA*, *copA* и *arsR*, индуцируемых в ответ на действие меди, цинка и мышьяка. *Молекулярная генетика, микробиол. вирусол.* 2020, № 3, стр 128-135. doi: 10.17116/molgen202038031128.
3. Rtimi S, Konstantinidis S, Britun N, Nadtochenko VA, Khmel IA, Kiwi J. New evidence for Ag-sputtered materials inactivating bacteria by surface-contact without the release of Ag-ions: end of a long controversy? *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2020, 12, 4, 4998–5007. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsam.9b15859> doi: 10.1021/acsam.9b15859. IF 8.758. Q1.
4. Koksharova O.A. Cyanobacterial VOCs as allelopathic tools. In *Bacterial Volatile Compounds as Mediators of Airborne Interactions*; Ryu, C., Weisskopf, L., Piechulla, B., Eds.; Springer Nature Singapore Pte Ltd.: Singapore, 2020, doi: 10.1007/978-981-15-7293-7.
5. Koksharova O.A., Butenko I.O., Pobeguts O.V., Safronova N.A., Govorun V.M. Proteomic Insights into starvation of nitrogen-replete cells of *Nostoc* sp. PCC 7120 under β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) treatment. *Toxins (Basel)*. 2020. V. 12(6). 372. doi: 10.3390/toxins12060372. doi: 10.3390/toxins12060372. IF 3.531 Q1.
6. Koksharova O.A., Butenko I.O., Pobeguts O.V., Safronova N.A., Govorun V.M. The first proteomics study of *Nostoc* sp. PCC 7120 exposed to cyanotoxin BMAA under nitrogen starvation. *Toxins (Basel)*. 2020. V. 12(5). 310. doi: 10.3390/toxins12050310. doi: 10.3390/toxins12050310. IF 3.531. Q1.
7. Potapova T.V., Koksharova O.A. Filamentous cyanobacteria as a prototype of multicellular organisms. *Russian Journal of Plant Physiology, издательство Maik Nauka/Interperiodica Publishing (Russian Federation)*, том 67, № 1, с. 17-30. doi: 10.1134/S102144372001015X.
8. Plyuta V. A , Chernikova A. S, Sidorova D. E, Kupriyanova E. V, Koksharova O. A, L .S, Khmel I. A. Modulation of *Arabidopsis thaliana* growth by volatile substances emitted by *Pseudomonas* and *Serratia* strains. *World J Microbiol Biotechnol* 2021, 37:82. doi: 10.1007/s11274-021-03047-w. IF 2.477. Q3.
9. Melkina O.E., Plyuta V.A., Khmel I.A., Zavgelsky G.B. The mode of action of cyclic monoterpenes (-)-limonene and (+)- α -pinene on bacterial

cells. *Biomolecules* 2021, 11(6):806. doi: 10.3390/biom11060806. IF 4.879. Q2.

10. Зайцева Ю.В., Кокшарова О.А., Плюта В.А., Демидюк И.В., Чернин Л.С., Хмель И.А. Особенности quorum sensing системы *SprIR Serratia proteamaculans* 94 и ее участие в регуляции клеточных процессов. *Генетика*, 2021, том 57, № 2, с. 165–178. IF 0.59.

11. Koksharova O.A., Butenko I.O., Pobeguts O. V., Safronova N.A., Govorun V.M. β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) causes severe stress in *Nostoc* sp. PCC 7120 cells under diazotrophic conditions: a proteomic study. *Toxins (Basel)* 2021, 13(5):325. doi: 10.3390/toxins13050325. IF 3.71. Q1.

12. Tsaplina O, Khmel I, Zaitseva Y, Khaitlina S. Invasion of *Serratia proteamaculans* is regulated by the *sprI* gene encoding AHL synthase. *Microbes Infect.* 2021 28:104852. doi: 10.1016/j.micinf.2021.104852. IF 2.7. Q2.

13. Tsaplina, O., Khmel, I., Zaitseva, Y., Khaitlina, S. The role of *SprIR* Quorum Sensing system in the regulation of *Serratia proteamaculans* 94 invasion. *Microorganisms* 2021, 9, 2082. doi: 10.3390/microorganisms9102082. IF 4.167. Q2.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

д.б.н. В.З. Тарантул

Лабораторией молекулярной нейрогенетики и
врожденного иммунитета

Для изучения возможных нарушений в метаболических путях и процессах, связанных с мутациями в гене *PARK2*, которые приводят к болезни Паркинсона (БП), использовали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), полученные от пациентов с БП и здоровых доноров. С помощью направленной дифференцировки из ИПСК были получены нейрональные предшественники (НП) и терминально дифференцированные нейроны (ТДН). Полнотранскриптомное секвенирование РНК (RNA-seq), выделенных из НП трех пациентов с БП, показало, что в них по сравнению со здоровыми донорами повышено транскрибируются группы генов, участвующие в процессах синаптической передачи

сигнала, нейрональной дифференцировки, нейрогенеза, межклеточного сигналинга, а также в формировании поведения. Среди генов, экспрессия которых понижена в НП у пациентов с БП по сравнению с нормой, присутствуют гены, связанные с регуляцией развития организма и морфогенезом, а также регуляцией двигательной активности, подвижности и миграции клеток. Особое внимание было обращено на высокий уровень экспрессии генов, кодирующих белки и длинные некодирующие РНК семейства HOX, которые полностью выключены в НП и ТДН здоровых доноров. В результате трансфекции клеток пациента с БП плазмидой с кДНК здорового гена *PARK2* была получена линия трансгенных НП с восстановленной экспрессией белка Паркина. Последующий анализ этой линии с помощью технологии RNA-seq позволил выявить 106 генов, экспрессия которых в «больных» клетках восстанавливалась до нормы. К ним относятся гены, участвующие в гибели нейронов, окислительном фосфорилировании, воспалительном ответе и др. С помощью ПЦР в режиме реального времени и Вестерн-блота установлено, что в НП и ТДН пациентов с БП происходят также значимые изменения экспрессии ряда генов семейства *TRIM* по сравнению с контролями. В НП пациентов с БП по сравнению со здоровыми донорами наблюдалось достоверное снижение уровня экспрессии генов *TRIM1* и *TRIM17*, в ТДН снижался уровень транскрипции гена *TRIM16*, а в клетках нейроглии снижен уровень транскрипции гена *TRIM34*. При этом по сравнению со здоровыми донорами увеличивалась транскрипция генов *TRIM9* и *TRIM14* в НП, генов *TRIM6*, *TRIM14* и *TRIM67* в ТДН и генов *TRIM6* и *TRIM41* в нейроглии. Анализ экспрессии генов семейства *Trim* на модели характерного для БП воспаления, вызванного инъекцией ЛПС мышам, показал снижение уровня транскрипции генов *Trim18* и *Trim24* в гипоталамусе. При этом уровни экспрессии этих генов у трансгенных мышей с геном *TRIM14* человека не изменялись. Можно предположить существование влияния повышенной экспрессии гена *TRIM14* на экспрессию генов *Trim18* и *Trim24* в мозге мышей при воспалении. Изучено также влияние на экспрессию генов семейства *TRIM* заражения мышей синегнойной палочкой *P. aeruginosa* и хламидией *C. muridarum*. Выяснилось, что бактериальная инфекция вызывает снижение транскрипции большинства этих генов в лимфоузлах и повышение их транскрипции в легких по сравнению с интактными мышами. Наблюдаемое усиление транскрипции многих

генов *TRIM* в легких мышей при заражении бактериальными патогенами разной природы вероятно связано с активацией врожденного иммунитета в дыхательной системе на начальных этапах заражения.

Публикации Лаборатории молекулярной нейрогенетики и врожденного иммунитета:

1. Nenasheva V.V., Tarantul V.Z. Many faces of TRIM proteins on the road from pluripotency to neurogenesis. *Stem Cells Dev.*, 2020, 29(1), 1-14. doi: 10.1089/scd.2019.0152. IF 3.272.
2. Novosadova E.V., Nenasheva V.V., Makarova I.V., Dolotov O.V., Inozemtseva L.S., Arsenyeva E.L., Chernyshenko S.V., Grivennikov I.A., Illarioshkin S.N., 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.*, 2020, 70(4), 514-521. DOI: 10.1007/s12031-019-01450-5. IF 3.444.
3. Gening L.V., Volodin A.A., Kazachenko K.Yu., Makarova I.V., Tarantul V.Z. Estimation of the Mutagenic Potential of 8-OxoG in Nuclear Extracts of Mouse Cells Using the "Framed Mirror" Method. *Methods and Protocols*, 2020, 3(1), 3-7. doi: 10.3390/mps3010003. IS 1.84.
4. Новосадова Е.В., Арсеньева Е.Л., Антонов С.А., Казанцева Е.А., Новосадова Л.В., Курко О.Д., Иллариошкин С.Н., Тарантул В.З., Гривенников И.А. Получение и характеристика глиальных клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. *Нейрохимия*, 2020, 37 (4), 358-367. IF 0.777.
5. 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.*, 2020, 70(2), 284-293. doi: 10.1007/s12031-019-01452-3. IF 3.444.
6. Shuvalova LD, Ereemeev AV, Bogomazova AN, Novosadova EV, Zerkalenkova EA, Olshanskaya YV, Fedotova EY, Glagoleva ES, Illarioshkin SN, Lebedeva OS, Lagarkova MA. Generation of induced pluripotent stem cell line RCPMi004-A derived from patient with Parkinson's disease with deletion of the exon 2 in PARK2 gene. *Stem Cell Res.* 2020, 44, 101733. doi: 10.1016/j.scr.2020.101733. IF 2.02.
7. Захидов С.Т., Муджири Н.М., Макарова И.В., Андреева Л.Е. Необычное поведение полового тельца (ПТ) в сперматогенезе у

мышей, подвергшихся мутагенному воздействию. Известия РАН. Серия биологическая, 2020, № 6, с. 581-585. IF 0.7.

8. Курко О.Д., Иноземцева Л.С., Глазова Н.Ю., Е.А. Себенцова Е.А., Марков Д.Д., Хухарева Д.Д., Левицкая Н.Г., Гривенников И.А., Долотов О.В. Эффекты хронического непредсказуемого стресса и острой низкодозовой эндотоксемии у крыс WISTAR HAN и SPRAGUE DAWLEY. Журнал высшей нервной деятельности им И. П. Павлова, 2020, 70(1), 86-103. IF 0.939.

9. Novosadova E., Antonov S., Arsenyeva E., Kobylanskiy A., Vanyushina Yu., Malova T., Khaspekov L., Bobrov M., Bezuglov V., Tarantul V., Illarionov S., Grivennikov I. Neuroprotective and neurotoxic effects of endocannabinoid-like compounds, N-arachidonoyl dopamine and N-docosahexaenoyl dopamine in differentiated cultures of induced pluripotent stem cells derived from patients with Parkinson's disease. Neurotoxicology, 2021, 82 (1), 108-118. DOI: 10.1016/j.neuro.2020.11.010. IF 4.294.

10. Kutukova K.A., Frumkina L.E., Ivanov M.V., E. V. Novosadova E.V., Antonov S.A., Grivennikov I.A., Illarionov S.N., Khaspekov L. Ultrastructural Organization of Ventral Mesencephalic Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. Human Physiology, 2020, 46(8):886-894 DOI: 10.1134/S0362119720080071. IF 1.124.

11. Nenasheva V., Nikitenko N.A., Stepanenko E.A., Makarova I.V., Andreeva L.E., Kovaleva G.V., Lysenko A.A., Tuhvatulin A.I., Logunov D.Y., Tarantul V.Z. Human TRIM14 protects transgenic mice from influenza A viral infection without activation of other innate immunity pathways. Genes & Immunity, 2021, 22(1), 56-63. DOI: 10.1038/s41435-021-00128-6. IF 2.676.

12. Nenasheva V.V., Makarova I.V., Stepanenko E.A., Antonov S.A., Novosadova E.V., Narsullaeva A.R., Kozikova L.V., Polteva E.A., Sleptsova L.A., Shcherbatova N.A., Khaidarova N.V., Andreeva L.E., Tarantul V.Z. Human TAF-1 α promotes oncogenic transformation via enhancement of cell proliferation and suppression of apoptosis. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal, 2021, 57(5), 531-538. DOI: 10.1007/s11626-021-00572-8. IF 2.416.

13. Tarantul V.Z., Gavrilenko A.V. Gene Therapy for Critical Limb Ischemia: Per aspera ad astra. Current Gene Therapy, 2021, 21(4), 1-14, DOI: 10.2174/1566523221666210712185742. IF 4.391.

14. Гривенников И.А., Тарантул В.З. Технология геномного редактирования для исследования и коррекции нейродегенеративных

заболеваний. *Нейрохимия*, 2021, 38 (4), 298-312. DOI: 10.31857/S1027813321040051. IF 0.777.

15. Antonov S.A., Novosadova E.V. Current State-of-the-Art and Unresolved Problems in Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease Drug Development. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22(7), 3381. doi: 10.3390/ijms22073381. IF 5.923.

ПРАЙМАЗА ДНК-ПОЛИМЕРАЗА ЧЕЛОВЕКА PrimPol

к.б.н. Алена В. Макарова, Е.О. Болдинова, Е.О. Манукян, А.С. Громова, Е.С. Шилкин, А.Д. Столяренко, Анна В. Макарова, А.А. Кручинин, А.А. Новикова, Я.Г. Белова
Лаборатория механизмов репликации поврежденной ДНК

ДНК-праймаза и ДНК-полимераза PrimPol является ядерным и митохондриальным ферментом, осуществляющим репликацию в поврежденных участках ДНК. PrimPol – единственный фермент человека, способный инициировать синтез ДНК *de novo*, используя dNTP. Ре-прайминг после поврежденных участков ДНК позволяет снять блок репликации. PrimPol обладает также транслезионной активностью и напрямую включает dNTP напротив ряда повреждений ДНК. Однако конкретные функции в клетке и механизм синтеза ДНК *de novo* PrimPol до конца не изучены.

Было проведено биохимическое исследование механизма праймазной активности PrimPol с использованием набора мутантных вариантов PrimPol, содержащих делеции и точечные замены ключевых остатков каталитического N-концевого или регуляторного C-концевого доменов. Была продемонстрирована роль остатков Arg47, Arg76, Arg288 и Asn289 в катализе, в том числе образовании комплекса PrimPol с ДНК и входящим нуклеотидом. Было показано, что PrimPol осуществляет праймазную активность по *cis*-механизму, когда в катализе принимает участие C-концевой домен и каталитический центр одной и той же молекулы. При этом отдельные домены PrimPol способны взаимодействовать по *trans*-механизму, соединяясь в функциональный белок. Обнаружено, что PrimPol в процессе синтеза ДНК *de novo* делает остановки при включении 20 и 30 нуклеотидов. Такие остановки возможны, если C-концевой домен продолжает удерживать инициаторный нуклеотидтрифосфат, а

каталитический домен, осуществляя синтез, отдаляется от него до тех пор, пока позволяет гибкий линкер. Разработана методика ферментативного синтеза и очистки ДНК-олигонуклеотида с трифосфатом на 5' конце. Показана ключевая роль 5'-трифосфата в образовании стабильного комплекса PrimPol с ДНК.

Впервые исследована транслезионная активность PrimPol *in vitro* на ДНК-субстратах с внутрицепочечной цисплатиновой и белковой сшивками, а также N2-аддуктами гуанина разного размера. Определены остатки активного центра, необходимые для транслезионной активности напротив цисплатиновой сшивки и N2-этенугуанина. Показано функциональное взаимодействие PrimPol с репликативными регуляторными факторами PolDIP2 и RPA при репликации поврежденной ДНК.

Получена линия клеток аденокарциномы легких человека A549 с нокаутом гена *PRIMPOL* и охарактеризован ответ клеток на повреждения ДНК, вызванные окислительным стрессом, ММС, химиотерапевтическими препаратами цисплатин и блеомицин.

Публикации Лаборатории механизмов репликации поврежденной ДНК:

1. Шилкин Е.С., Петрова Д.В., Полтораченко В.А., Болдинова Е.О., Жарков Д.О., Макарова А.В. Матричные свойства 5-метил-2'-дезоксцитидина и 5-гидроксиметил-2'-дезоксцитидина в реакциях с транслезионными и репаративными ДНК-полимеразами человека // Молекулярная биология, 2021, 2(55), 305-311, IF=1.374
2. Shilkin E.S., Gromova A.S., Smal M.P., Makarova A.V. DNA Polymerase and dRP-lyase activities of polymorphic variants of human Pol ϵ // Biochem. J. 2021, 478(7):1399-1412. Q1 IF=3.857
3. Boldinova E.O., Manukyan A.A., Makarova A.V. The DNA ligands Arg47 and Arg76 are crucial for catalysis by human PrimPol // DNA Repair, 2021, 100:103048. Q1 IF=4.913
4. Boldinova E.O., Yudkina A.V., Shilkin E.S., Gagarinskaya D.I., Baranovskiy A.G., Tahirov T.H., Zharkov D.O., Makarova A.V. Translesion activity of PrimPol on DNA with cisplatin and DNA-protein cross-links // Sci. Rep. 2021, 11:17588. Q1 IF=4.379
5. Baranova A., Chandhoke V., Makarova A.V., Veytsman B. In a search of a protective titer: Do we or do we not need to know? // Clin. Transl. Med. 2021, 11(12): e668. Q1 IF=11.492

ПЕРСИСТЕНЦИЯ ПЛАЗМИД В УСЛОВИЯХ CRISPR ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

д.б.н. К.В. Северинов

Лаборатория регуляции экспрессии генов
мобильных элементов прокариот

Системы CRISPR-Cas защищают прокариот от чужеродных мобильных генетических элементов (МГЭ), таких, как плазмиды и вирусы. Защита достигается за счет малых CRISPR РНК, которые направляют Cas нуклеазы к комплементарным участкам ДНК МГЭ. МГЭ способны избегать защитного действия CRISPR-Cas (интерференции) путем накопления мутаций, нарушающих комплементарность с CRISPR РНК. В данной работе мы изучали как система CRISPR-Cas из *Escherichia coli* противодействует поддержанию плазмиды с участками, комплементарными CRISPR РНК. Мы показали, что небольшая часть клеток в бактериальной популяции способна в течении длительного времени сохранять плазмиды в условиях непрерывной CRISPR интерференции. При этом, в плазмиде не накапливаются мутации, изменяющие степень комплементарности с CRISPR РНК. С помощью математического моделирования мы показали, что персистенция плазмид в субпопуляции клеток с активной CRISPR-Cas системой, достигается благодаря стохастической природе процессов CRISPR интерференции и репликации плазмиды. Мы предполагаем, что наблюдаемая динамика обеспечивает бактериальным популяциям долгосрочные преимущества за счет поддержания в некоторых клетках МГЭ и диверсификации фенотипов во всем сообществе. Это позволяет быстро изменять структуру популяции в случае изменения условий окружающей среды.

Публикации Лаборатории регуляции экспрессии генов мобильных элементов прокариот:

1. Dimitriu, T., Kurilovich, E., Łapińska, U., Severinov, K., Pagliara, S., Szczelkun, M. D., & Westra, E. R. (2022). Bacteriostatic antibiotics promote CRISPR-Cas adaptive immunity by enabling increased spacer acquisition. *Cell host & microbe*, 30(1), 31–40.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.11.014>

2. Kirillov, B., Savitskaya, E., Panov, M., Ogurtsov, A. Y., Shabalina, S. A., Koonin, E. V., & Severinov, K. V. (2021). Uncertainty-aware and interpretable evaluation of Cas9-gRNA and Cas12a-gRNA specificity for fully matched and partially mismatched targets with Deep Kernel Learning. *Nucleic acids research*, gkab1065. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1065>
3. Rykachevsky, A., Stepanov, A., Muzyukina, P., Medvedeva, S., Dobrovolski, M., Burnaev, E., Severinov, K., & Savitskaya, E. (2021). SCRAMBLER: A Tool for De Novo CRISPR Array Reconstruction and Its Application for Analysis of the Structure of Prokaryotic Populations. *The CRISPR journal*, 4(5), 673–685. <https://doi.org/10.1089/crispr.2021.0012>
4. Maikova, A., Boudry, P., Shiriaeva, A., Vasileva, A., Boutserin, A., Medvedeva, S., Semenova, E., Severinov, K., & Soutourina, O. (2021). Protospacer-Adjacent Motif Specificity during *Clostridioides difficile* Type I-B CRISPR-Cas Interference and Adaptation. *mBio*, 12(4), e0213621. <https://doi.org/10.1128/mBio.02136-21>
5. Medvedeva, S., Brandt, D., Cvirkaite-Krupovic, V., Liu, Y., Severinov, K., Ishino, S., Ishino, Y., Prangishvili, D., Kalinowski, J., & Krupovic, M. (2021). New insights into the diversity and evolution of the archaeal mobilome from three complete genomes of *Saccharolobus shibatae*. *Environmental microbiology*, 23(8), 4612–4630. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15654>
6. Grigoreva, A., Andreeva, J., Bikmetov, D., Rusanova, A., Serebryakova, M., Garcia, A. H., Slonova, D., Nair, S. K., Lippens, G., Severinov, K., & Dubiley, S. (2021). Identification and characterization of andalusicin: N-terminally dimethylated class III lantibiotic from *Bacillus thuringiensis* sv. andalousiensis. *iScience*, 24(5), 102480. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102480>
7. Musharova, O., Medvedeva, S., Klimuk, E., Guzman, N. M., Titova, D., Zgoda, V., Shiriaeva, A., Semenova, E., Severinov, K., & Savitskaya, E. (2021). Prespacers formed during primed adaptation associate with the Cas1-Cas2 adaptation complex and the Cas3 interference nuclease-helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(22), e2021291118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021291118>
8. Isaev, A. B., Musharova, O. S., & Severinov, K. V. (2021). Microbial Arsenal of Antiviral Defenses. Part II. *Biochemistry. Biokhimiia*, 86(4), 449–470. <https://doi.org/10.1134/S0006297921040064>

9. Isaev, A. B., Musharova, O. S., & Severinov, K. V. (2021). Microbial Arsenal of Antiviral Defenses - Part I. Biochemistry. *Biokhimiia*, 86(3), 319–337. <https://doi.org/10.1134/S0006297921030081>
10. Shmakov, S. A., Utkina, I., Wolf, Y. I., Makarova, K. S., Severinov, K. V., & Koonin, E. V. (2020). CRISPR Arrays Away from cas Genes. *The CRISPR journal*, 3(6), 535–549. <https://doi.org/10.1089/crispr.2020.0062>
11. Drobysheva, A. V., Panafidina, S. A., Kolesnik, M. V., Klimuk, E. I., Minakhin, L., Yakunina, M. V., Borukhov, S., Nilsson, E., Holmfeldt, K., Yutin, N., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Severinov, K. V., Leiman, P. G., & Sokolova, M. L. (2021). Structure and function of virion RNA polymerase of a crAss-like phage. *Nature*, 589(7841), 306–309. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2921-5>
12. Fedorova, I., Vasileva, A., Selkova, P., Abramova, M., Arseniev, A., Pobegalov, G., Kazalov, M., Musharova, O., Goryanin, I., Artamonova, D., Zyubko, T., Shmakov, S., Artamonova, T., Khodorkovskii, M., & Severinov, K. (2020). PpCas9 from *Pasteurella pneumotropica* - a compact Type II-C Cas9 ortholog active in human cells. *Nucleic acids research*, 48(21), 12297–12309. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa998>
13. Wiegand, T., Semenova, E., Shiriaeva, A., Fedorov, I., Datsenko, K., Severinov, K., & Wiedenheft, B. (2020). Reproducible Antigen Recognition by the Type I-F CRISPR-Cas System. *The CRISPR journal*, 3(5), 378–387. <https://doi.org/10.1089/crispr.2020.0069>
14. Terekhov, S. S., Eliseev, I. E., Ovchinnikova, L. A., Kabilov, M. R., Pribelski, A. D., Tupikin, A. E., Smirnov, I. V., Belogurov, A. A., Jr, Severinov, K. V., Lomakin, Y. A., Altman, S., & Gabibov, A. G. (2020). Liquid drop of DNA libraries reveals total genome information. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(44), 27300–27306. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017138117>
15. Ceyssens, P. J., De Smet, J., Wagemans, J., Akulenko, N., Klimuk, E., Hedge, S., Voet, M., Hendrix, H., Paeshuyse, J., Landuyt, B., Xu, H., Blanchard, J., Severinov, K., & Lavigne, R. (2020). The Phage-Encoded N-Acetyltransferase Rac Mediates Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* Transcription by Cleavage of the RNA Polymerase Alpha Subunit. *Viruses*, 12(9), 976. <https://doi.org/10.3390/v12090976>
16. Artamonova, D., Karneyeva, K., Medvedeva, S., Klimuk, E., Kolesnik, M., Yasinskaya, A., Samolygo, A., & Severinov, K. (2020). Spacer acquisition by Type III CRISPR-Cas system during bacteriophage infection of *Thermus thermophilus*. *Nucleic acids research*, 48(17), 9787–9803. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa685>

17. Klimuk, E., Mekler, V., Lavysch, D., Serebryakova, M., Akulenko, N., & Severinov, K. (2020). Novel Escherichia coli RNA Polymerase Binding Protein Encoded by Bacteriophage T5. *Viruses*, 12(8), 807. <https://doi.org/10.3390/v12080807>
18. Shmakov, S. A., Wolf, Y. I., Savitskaya, E., Severinov, K. V., & Koonin, E. V. (2020). Mapping CRISPR spaceromes reveals vast host-specific viromes of prokaryotes. *Communications biology*, 3(1), 321. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1014-1>
19. Selkova, P., Vasileva, A., Pobegalov, G., Musharova, O., Arseniev, A., Kazalov, M., Zyubko, T., Shcheglova, N., Artamonova, T., Khodorkovskii, M., Severinov, K., & Fedorova, I. (2020). Position of Deltaproteobacteria Cas12e nuclease cleavage sites depends on spacer length of guide RNA. *RNA biology*, 17(10), 1472–1479. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1777378>
20. Travin, D. Y., Bikmetov, D., & Severinov, K. (2020). Translation-Targeting RiPPs and Where to Find Them. *Frontiers in genetics*, 11, 226. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00226>
21. Mekler, V., Kuznedelov, K., & Severinov, K. (2020). Quantification of the affinities of CRISPR-Cas9 nucleases for cognate protospacer adjacent motif (PAM) sequences. *The Journal of biological chemistry*, 295(19), 6509–6517. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012239>

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОМА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛОЙ ФОРМОЙ COVID-19: РОЛЬ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПУТИ РЕЦЕПТОРА ЛНП В ОПРЕДЕЛЕНИИ ТРАЕКТОРИИ РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

д.б.н. П.А. Сломинский

Лаборатория молекулярных основ
наследственных болезней

COVID-19 - острое инфекционное заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2 из семейства коронавирусов HCoV. Ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) служит точкой входа для SARS-CoV-2. Связывание белка S1 вируса с этим белком приводит к быстрой интернализации вируса клетками, экспрессирующими ACE2, в первую очередь клетками эпителия верхних дыхательных путей, альвеолоцитами и энтероцитами тонкой кишки. Новые вирусные

частицы SARS-CoV-2, созревающие в инфицированных эпителиальных клетках альвеол, путем экзоцитоза попадают в легочную ткань, что приводит к выбросу большого количества провоспалительных цитокинов, инфильтрации легочной ткани макрофагами, нейтрофилами и Т-клетки и - в конечном итоге - острого респираторного дистресс-синдрома. Дальнейшее течение патологического процесса у больных в критическом состоянии зависит от ряда факторов, таких как возраст, наличие коморбидных состояний, уровень D-димеров и лактата в периферической крови. Также обсуждается возможность того, что генетический фон также может влиять на исход COVID-19. С целью выявления генетических факторов, влияющих на исход тяжелой формы COVID-19, требующей интенсивной терапии и реанимации, мы провели исследование транскриптома лимфоцитов периферической крови у пациентов на момент поступления в отделение реанимации с проспективной оценкой исхода заболевания в остром периоде (30 дней). Три различных биоинформатических подхода к анализу данных РНУ секвенирования выявили сниженный уровень экспрессии трех общих путей у выживших по сравнению с не выжившими среди пациентов с тяжелой формой COVID-19, а именно пути активности рецептора частиц липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) (GO:0005041), пути поддержания гомеостаза холестерина и дифференцировки лейкоцитов (GO:0002521), карго рецепторной активности (GO:0038024). В частности, лимфоциты от выживших пациентов характеризовались сниженной экспрессией генов *PPARG*, *CD36*, *STAB1*, *ITGAV* и *ANXA2*. В совокупности полученные результаты показывают, что активация пути активности рецепторов частиц липопротеинов низкой плотности у пациентов с инфекцией COVID-19 связана с плохим прогнозом заболевания.

Публикации Лаборатории молекулярных основ наследственных болезней:

1. Filatova EV, Krylova NS, Vlasov IN, Maslova MS, Poteshkina NG, Slominsky PA, Shadrina MI. Targeted exome analysis of Russian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Genet Genomic Med.* 2021 Nov;9(11):e1808. doi: 10.1002/mgg3.1808. Epub 2021 Oct 1. PMID: 34598319; PMCID: PMC8606207. IF- 2.18; Q3

2. Alieva AK, Filatova EV, Rudenok MM, Slominsky PA, Shadrina MI. Housekeeping Genes for Parkinson's Disease in Humans and Mice. *Cells*. 2021 Aug 30;10(9):2252. doi: 10.3390/cells10092252. PMID: 34571901; PMCID: PMC8470043. IF- 6.6; Q1
3. Shadrina M, Slominsky P. Modeling Parkinson's Disease: Not Only Rodents? *Front Aging Neurosci*. 2021 Aug 6;13:695718. doi: 10.3389/fnagi.2021.695718. PMID: 34421573; PMCID: PMC8377290. IF- 5.75; Q1
4. Rafikova E, Shadrina M, Slominsky P, Guekht A, Ryskov A, Shibalev D, Vasilyev V. SLC6A3 (DAT1) as a Novel Candidate Biomarker Gene for Suicidal Behavior. *Genes (Basel)*. 2021 Jun 4;12(6):861. doi: 10.3390/genes12060861. PMID: 34199792; PMCID: PMC8227035. IF- 4.1; Q2
5. Filatova EV, Shadrina MI, Slominsky PA. Major Depression: One Brain, One Disease, One Set of Intertwined Processes. *Cells*. 2021 May 21;10(6):1283. doi: 10.3390/cells10061283. PMID: 34064233; PMCID: PMC8224372. IF- 6.6; Q1
6. Vlasov, I.; Panteleeva, A.; Usenko, T.; Nikolaev, M.; Izumchenko, A.; Gavrilova, E.; Shlyk, I.; Miroshnikova, V.; Shadrina, M.; Polushin, Y.; Pchelina, S.; Slonimsky, P. Transcriptomic Profiles Reveal Downregulation of Low-Density Lipoprotein Particle Receptor Pathway Activity in Patients Surviving Severe COVID-19. *Cells* 2021, 10, 3495. <https://doi.org/10.3390/cells10123495>. IF-6.6, Q1
7. Vlasov, I.N.; Alieva, A.K.; Novosadova, E.V.; Arsenyeva, E.L.; Rosinskaya, A.V.; Partevian, S.A.; Grivennikov, I.A.; Shadrina, M.I. Transcriptome Analysis of Induced Pluripotent Stem Cells and Neuronal Progenitor Cells, Derived from Discordant Monozygotic Twins with Parkinson's Disease. *Cells* 2021, 10, 3478. <https://doi.org/10.3390/cells10123478>. IF-6.6, Q1.
8. Семенова Е.И., Руденко М.М., Алиева А.Х., Карабанов А.В., Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А., Шадрина М.И. Анализ относительных уровней экспрессии генов DNM2, EPN2 и EХОС4 в периферической крови пациентов с болезнью Паркинсона. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2021;39(3):25-30. <https://doi.org/10.17116/molgen20213903125>
9. Влияние полиморфных вариантов генов дофаминергической системы на риск развития расстройств с депрессивной симптоматикой / Е. И. Рафикова, Д. В. Шибалев, М. И. Шадрина [и др.] // *Генетика*. – 2021. – Т. 57. – № 8. – С. 941-948. – DOI 10.31857/S0016675821070110.

10. Hess JL, Tylee DS, Mattheisen M; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium; Lundbeck Foundation Initiative for Integrative Psychiatric Research (iPSYCH), Børglum AD, Als TD, Grove J, Werge T, Mortensen PB, Mors O, Nordentoft M, Hougaard DM, Byberg-Grauholm J, Bækvad-Hansen M, Greenwood TA, Tsuang MT, Curtis D, Steinberg S, Sigurdsson E, Stefánsson H, Stefánsson K, Edenberg HJ, Holmans P, Faraone SV, Glatt SJ. A polygenic resilience score moderates the genetic risk for schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2021 Mar;26(3):800-815. doi: 10.1038/s41380-019-0463-8. Epub 2019 Sep 6. PMID: 31492941; PMCID: PMC7058518.
11. Ni G, Zeng J, Revez JA, Wang Y, Zheng Z, Ge T, Restuadi R, Kiewa J, Nyholt DR, Coleman JRI, Smoller JW; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium; Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Yang J, Visscher PM, Wray NR. A Comparison of Ten Polygenic Score Methods for Psychiatric Disorders Applied Across Multiple Cohorts. *Biol Psychiatry*. 2021 Nov 1;90(9):611-620. doi: 10.1016/j.biopsych.2021.04.018. Epub 2021 May 4.

АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В КОНТРОЛЬ МИГРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ОПУХОЛЕЙ

Член-корр. С.В. Костров

Лаборатория анализа клинических и модельных опухолевых патологий на организменном уровне

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

Анализ генетического контроля миграционной активности опухолевых клеток

С использованием разработанной ранее трансплантационной модели на основе развивающихся эмбрионов *Danio rerio* охарактеризована миграционная активность клеток линий рака поджелудочной железы человека PANC-1, MIA PaCa-2, Colo357 и AsPC-1, а также линии рака молочной железы человека MDA-MB231 и линии колоректального рака человека SW620. Работа проводилась совместно с сотрудниками ИБХ РАН.

Показано, что клетки данных линий характеризуются различающейся миграционной активностью. При этом количество эмбрионов, для которых наблюдалась миграция маркированных опухолевых клеток из зоны трансплантации, составляло 13,3% для линии PANC-1, 6,2% для линии Colo357, 4,9% для линии SW620, 1,4% для линии MDA-MB231, 1,2% для линии AsPC-1 и 0% для линии MIA PaCa-2.

Проанализировано влияние регуляторных генов *PDX1*, *KLF5*, *ZEB-1*, *FOXA2* и *SOX9* на миграционную активность клеток указанных опухолевых линий. Показано, что повышение уровня экспрессии гена *PDX1* понижает уровень миграции для клеток линии PANC-1 (с 13,3% до 4,5%), Colo357 (с 6,02% до 0%) и SW620 (с 4,9% до 2%). Понижение уровня экспрессии генов *FOXA2* и *SOX9* оказывает антимиграционное действие на клетки линии PANC-1, снижая их миграционную активность до 0% и 0,9% соответственно. Для остальных проанализированных регуляторных генов влияния на миграционный потенциал раковых клеток обнаружено не было.

Анализ механизмов формирования опухоль-ассоциированных фибробластов (CAF)

Проведено сравнительное изучение эффективности активации фибробластов человека клетками опухолевых линий *in vitro* в ходе культивации и под действием кондиционированных сред. В экспериментах использовали фибробласты кожи человека и клетки линий рака поджелудочной железы человека PANC-1 и MIA PaCa-2. Для оценки степени активации проводили количественный анализ уровней экспрессии генов - маркеров опухоль-ассоциированных фибробластов (*ACTA2*, *PDGFRA*, *IL-6*) и анализ изменения морфологических параметров клеток. Полученные данные указывают на наличие нескольких стадий формирования CAF под действием опухолевых клеток, осуществляемых, по-видимому, с использованием различных механизмов и нацеленных на реализацию различных биологических задач. Так, нами обнаружено быстрое повышение миграционной активности фибробластов под действием кондиционированных сред опухолевых клеток. Это позволяет предположить, что на ранней стадии активации может происходить привлечение стромальных фибробластов к развивающейся опухоли в результате влияния паракринных факторов, секретируемых раковыми клетками. При этом изменение морфологического статуса фибробластов при их паракринной активации раковыми клетками

происходит существенно позже, чем активация миграционной способности, и наиболее эффективно индуцируется при культивировании с опухолевыми клетками. Таким образом, перестройка клеточной морфологии, по-видимому, индуцируется уже после приближения стромальных фибробластов к опухоли и может быть направлена на реализацию иной биологической функции.

При этом наблюдаемая паракринная активация, по-видимому, непосредственно не затрагивает молекулярные механизмы, связанные с генетическими сетями, включающими использованные маркерные гены, поскольку экспрессия генов *PDGFRA* и *ACTA2* не изменяется, а снижение экспрессии гена *IL-6* обнаруживается лишь на самых поздних стадиях культивирования. В то же время, после непосредственного контакта фибробластов с опухолевыми клетками происходит быстрая смена их морфологического статуса и опухоль-зависимое изменение экспрессии маркерных генов. Таким образом, непосредственное взаимодействие с раковыми клетками приводит к вовлечению в активационный процесс дополнительных молекулярных механизмов, не индуцируемых при паракрином воздействии. При этом необходимо отметить, что, несмотря на наличие у фибробластов, полученных в результате культивирования с клетками PANC-1 и MIA PaCa-2, характерных признаков активации, таких как изменение морфологического статуса и уровней экспрессии CAF-ассоциированных маркеров, они оказались не способны влиять на миграционную эффективность опухолевых клеток, определяемую в тестах *in vivo* с использованием трансплантационной модели на основе развивающихся эмбрионов *Danio rerio*. По-видимому, приобретение способности к осуществлению CAF-зависимого транспорта опухолевых клеток связано с необходимостью вовлечения дополнительных активационных механизмов, возможно действующих на специфические субпопуляции CAF.

Разработка методов анализа поведенческих реакций на модели *Danio rerio*

С использованием рыб *Danio rerio* отработаны тесты поведенческих реакций, предназначенные для определения уровня тревожности животного в новом пространстве («Открытое поле»), агрессивности по отношению к другому животному того же вида (тест с зеркалом) и степени социализации объекта (тест на стайное поведение). Анализ поведенческих реакций осуществляли по общим

параметрам, таким как пройденная дистанция, средняя скорость передвижения, время, за которое рыба двигалась или находилась без движения, время, проведенное в различных зонах арены и количество пересечений границ между зонами, а также по специфическим параметрам, таким как количество атак и латентное время до первой атаки. Разработанная методология позволяет осуществлять эксперименты по оценке влияния генетических модификаций и биохимических воздействий на поведенческие реакции животных.

НОВОЕ СЕМЕЙСТВО I104 БЕЛКОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕАЗ

д.б.н. И.В. Демидюк

Лаборатория функциональной энзимологии
ОМГОБиБИ

Протеолиз принципиально важен для функционирования всех живых организмов. Неотъемлемым элементом регуляции протеолиза являются белковые ингибиторы протеаз (БИП). Однако многие принципы такой регуляции остаются невыясненными, а многие БИП, по-видимому, до сих пор неизвестны.

Недавно нами обнаружен и охарактеризован новый БИП из *Serratia proteamaculans*, эмфорин (M4in), а также показано, что этот ингибитор является прототипом нового семейства БИП, представители которого широко распространены у бактерий и встречаются у архей. В 2021 году это семейство было включено в классификацию базы данных MEROPS (релиз 12.4). Семейству присвоен идентификатор I104 (<https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=i104>).

В известных геномных последовательностях бактерий и архей идентифицировано более тысячи генов БИП семейства I104. Эти гены кодируют небольшие белки с молекулярной массой 8-13 кДа и всегда расположены непосредственно после генов протеализинподобных протеаз (ППП) – группы металлопротеаз, относящихся к семейству пептидаз M4. В настоящее время нами охарактеризовано два представителя семейства ингибиторов I104: M4in и его гомолог из энтомопатогенной бактерии *Photorhabdus luminiscens*, фоторин (42rin). Оба белка способны подавлять активность пептидаз семейства M4, в

том числе не относящихся к группе ППП. В то же время специфичность действия ингибиторов различается. Показано, что M4in и 42in являются сильными конкурентными медленно связывающимися ингибиторами металлопротеаз.

Установленная нами пространственная структура M4in (PDB ID: 6ZYG) не имеет значимого сходства с известными структурами белков. Анализ этой структуры позволил сформулировать гипотезу о молекулярном механизме действия ингибиторов семейства. С использованием метода сайт-направленного мутагенеза гипотеза была экспериментально проверена на модели M4in. Продемонстрировано, что ингибиторы семейства I104 работают по неканоническому механизму, а ключевыми остатками их активных центров являются остаток Asp70 (нумерация по последовательности M4in), образующий координационную связь с ионом цинка каталитического центра фермента, а также остатки Phe21 и Ala22, взаимодействующие с сайтом связывания субстрата.

Биологические функции ингибиторов семейства I104 не установлены. В то же время колокализация генов ингибиторов и ППП указывает на функциональную взаимосвязь белков I104 и ППП. По-видимому, задачей I104 является подавление активности этих ферментов, однако физиологическая роль такого ингибирования неясна. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что I104 могут быть необходимы для подавления aberrантной активации протеаз внутри бактериальной клетки или ингибировать активность ППП, попадающих в бактериальную клетку извне. Однако существующие данные не полны и противоречивы. Кроме того, нельзя исключить, что функции белков I104 различны у разных микроорганизмов.

Итак, эмфориноподобные ингибиторы представляют собой новое семейство белковых ингибиторов протеаз. Для белков семейства характерна уникальная пространственная укладка и неканонический механизм действия. Природной мишенью этих ингибиторов являются протеализинподобные протеазы, однако физиологическая роль подавления их активности и причины строгой ассоциации генов протеаз и ингибиторов не установлены. Таким образом, дальнейшие исследования ингибиторов I104 и, в первую очередь, их биологических функций может дать информацию о новых принципах регуляции протеолиза в живых организмах.

ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА АНТИОНКОРАН-М

**к.б.н. И.В. Алексеенко, М.Б. Костина, М.В. Зиновьева,
В.В. Плешкан, А.И. Кузьмич, С.А. Кондратьева,
О.А. Безбородова, академик Е.Д. Свердлов**
Сектор генной онкотерапии ОМГОБиБИ

Препарат АнтионкоРАН-М – генотерапевтическое противоопухолевое средство, содержащее сверхскрученную плазмидную ДНК, включающую два терапевтических гена: ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSVtk) и ген гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (GM-CSF). Лекарственная форма АнтионкоРАН-М – раствор для внутриопухолевого введения. Препарат АнтионкоРАН-М поставляется в комплекте, состоящим из двух флаконов: флакон с Компонентом А и флакон с Компонентом Б. Компонент А содержит сверхскрученную плазмидную ДНК (плДНК) rTKmGM. Компонент Б – блок-сополимер полиэтиленимин: полиэтиленгликоль: ТАТ-пептид (ППТ).

В рамках изучения фармакокинетики модельного препарата АнтионкоРАН-М(т) получены данные о его биораспределении в органах и тканях мышей на уровне его компонентов при внутриопухолевом, внутривенном и подкожном способах введения. Не было выявлено зависимости биораспределения плДНК rTKmGM препарата от пола животных при внутривенном и подкожном путях введения, а также от величины введенной дозы (ТД и 4 ТД) при подкожном введении. Однако была отмечена дозозависимость при внутривенном способе введения. Характер биораспределения определялся способом введения препарата, при этом широта биораспределения плДНК rTKmGM в организме животных снижалась в ряду внутривенный > внутриопухолевый > подкожный путь введения.

При внутриопухолевом введении максимальное содержание плДНК rTKmGM детектировали в опухоли через 48 ч после введения. Среди других органов значимые количества плДНК регистрировали в лимфатических узлах через 48 ч после введения. К окончанию эксперимента (45 сутки после введения препарата) плДНК детектировали только в опухоли (0,02 % от первоначального уровня).

Также при внутриопухолевом введении максимальное количество меченого блок-сополимера ППТ наблюдали в опухоли через 48 ч после введения (5,3% от введенной дозы меченого ППТ) и в почках через 24 ч после введения (11,3 % от введенной дозы). В печени, почках и опухоли меченый блок-сополимер ППТ фиксировался до 14 суток наблюдения на уровне предела обнаружения, а к 30 суткам ни в одном органе/ткани не обнаруживался.

Анализ иммунопероксидазного окрашивания срезов тканей показал, что на протяжении 10 суток белок HSVtk определяется в месте введения препарата – в опухоли и окружающей опухоль ткани. Максимальный уровень HSVtk в опухоли наблюдали на 2 сутки после однократного введения препарата, через 5 суток количество HSVtk-позитивных клеток снижалось, а на 10 сутки количественно HSVtk-позитивных клеток было значительно меньше, чем на 2 и 5 сутки. На 20 сутки в ткани опухоли фермент HSVtk не детектировался, фермент не обнаруживался на 20 день наблюдения и в образцах ткани матки, лёгких, почки, селезёнки и сердца. В паренхиме печени мышей обнаруживались лишь единичные позитивно окрашенные клетки.

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

1. Kondratyeva L., Chernov I., Kopantzev E., Dmitry Didych D., Kuzmich A., Alekseenko I., Kostrov S., Sverdlov E. Pancreatic Lineage Specifier PDX1 Increases Adhesion and Decreases Motility of Cancer Cells. // *Cancers* (Basel). 2021. 13(17). P. 4390. doi: 10.3390/cancers13174390.
2. Shubin A.V., Komissarov A.A., Karaseva M.A., Padman B.S., Kostrov S.V., Demidyuk I.V. Human hepatitis A virus 3C protease exerts a cytostatic effect on *Saccharomyces cerevisiae* and affects the vacuolar compartment. // *Biologia*. 2021. V.76. № 1. P.321–327. doi: 10.2478/s11756-020-00569 w.
3. Зайцева Ю.В., Липасова В.А., Кокшарова О.А., Плюта В.А., Демидюк И.В., Чернин Л.С., Хмель И.А. Особенности quorum sensing системы SprIR *Serratia proteamaculans* 94 и ее участие в регуляции клеточных процессов. // *Генетика*. 2021. Т. 57. № 2. С. 165-178. doi: 10.31857/S0016675821020144
4. Chukhontseva K.N., Berdyshev I.M., Safina D.R., Karaseva M.A., Bozin T.N., Salnikov V.V., Konarev P.V., Volkov V.V., Grishin A.V., Kozlovskiy V.I., Kostrov S.V., Demidyuk I.V. The protealysin operon encodes emfourin, a prototype of a novel family of protein metalloprotease inhibitors. //

International Journal of Biological Macromolecules. 2021. V. 69. P. 583-596. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.170.

5. Bozin T.N., Chukhontseva K.N., Lesovoy D.M., Filatov V.V., Kozlovskiy V.I., Demidyuk I.V., Bocharov E.V. NMR assignments and secondary structure distribution of emfourin, a novel proteinaceous protease inhibitor. // *Biomolecular NMR Assignments*. 2021. 15. P. 361–366. doi: 10.1007/s12104-021-10030-x.

6. Komissarov A.A., Karaseva M.A., Roschina M.P., Shubin A.V., Lunina N.A., Kostrov S.V., Demidyuk I.V. Individual expression of hepatitis A virus 3C protease induces ferroptosis in human cells in vitro. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. 22. 7906. doi: 10.3390/ijms22157906.

7. Selina P.I., Karaseva M.A., Komissarov A.A., Safina D.R., Lunina N.A., Roschina M.P., Sverdlov E.D., Demidyuk I.V., Kostrov S.V. Embryotoxic activity of 3C protease of human hepatitis A virus in developing *Danio rerio* embryos. // *Scientific Reports*. 2021. 11(1). P. 18196. doi: 10.1038/s41598-021-97641-5.

8. Rettenmaier R., Thieme N., Streubel J., Di Bello L., Kowollik M.L., Huang L., Maus I., Klingl A., Liebl W., Zverlov V.V. *Variimorphobacter saccharofermentans* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Lachnospiraceae, isolated from a maize-fed biogas fermenter. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2021. 71(11). doi: 10.1099/ijsem.0.005044.

9. Thieme N., Liebl W., Zverlov V.V. Draft genome sequence of *Clostridium beijerinckii* strain mbf-VZ-132, isolated from an environmental soil sample. // *Microbiology Resource Announcements*. 2021. 10(17):e00131-21. doi: 10.1128/MRA.00131-21.

10. Thieme N., Rettenmaier R., Liebl W., Zverlov V.V. Draft genome sequence of *Mobilitalea sibirica* strain P3M-3T, the sole representative of the genus *Mobilitalea*. // *Microbiology Resource Announcements*. 2021. 10(13):e00129-21. doi: 10.1128/MRA.00129-21.

11. Berezina O.V., Rykov S.V., Polyakova A.K., Bozdaganyan M.E., Sidochenko A.V., Baudrexel M., Schwarz W.H., Zverlov V.V., Yarotsky S.V. Strategic aromatic residues in the catalytic cleft of the xyloglucanase MtXgh74 modifying thermostability, mode of enzyme action, and viscosity reduction ability. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021. 105(4):1461-1476. doi: 10.1007/s00253-021-11106-3.

12. Rettenmaier R, Kowollik ML, Klingl A, Liebl W, Zverlov V. *Ruminiclostridium herbifermentans* sp. nov., a mesophilic and moderately thermophilic cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from a lab-

scale biogas fermenter fed with maize silage. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2021. 71(3). doi: 10.1099/ijsem.0.004692.

13. Isci A., Thieme N., Lamp A., Zverlov V., Kaltschmitt M. Production of xylo-oligosaccharides from wheat straw using microwave assisted deep eutectic solvent pretreatment. // Industrial Crops and Products. 2021. 164:113393. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113393