

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

**XXIV ЕЖЕГОДНАЯ НАУЧНАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ**

22-24 июня 2015 г., Москва

ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

22 июня, понедельник

Утреннее заседание, начало в 10 часов

Открытие конференции

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

Председатель - Н.Ф. Мясоедов

Е.Д. СВЕРДЛОВ – зав. Лабораторией онкогеномики, советник РАН. «Противоопухолевые генно-терапевтические препараты АнтионкоРАН и ГенТерПлюс. Результаты доклинических исследований». (30 мин)

В.А. ГВОЗДЕВ – зав. Отделом молекулярной генетики клетки (ОМГК). «РНК-связывающие белки в герминальных и прилегающих соматических клетках в развитии яичников и семенников дрозофилы». (30 мин)

Ю.Я. ШЕВЕЛЕВ - зав. Лабораторией анализа регуляции генов ОМГК. «Роль ядерной ламины в поддержании связи хромосом с ядерной оболочкой». (25 мин)

П е р е р ы в (15 мин)

Е.Г. ПАСЮКОВА - зав. Лабораторией геномной изменчивости ОМГК. «Исследование механизмов контроля продолжительности жизни у дрозофилы». (25 мин)

А.И. КАЛМЫКОВА – зав. Лабораторией исследования геномных повторов эукариот. «Роль теломерного комплекса в раннем развитии *Drosophila*». (20 мин)

Дискуссия (10 мин)

22 июня, понедельник

Вечернее заседание, начало в 16 часов

Председатель – И.А. Хмель

А.В. КУЛЬБАЧИНСКИЙ - зав. Лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов ОМГК. «Структура и функции РНК-полимеразы и механизмы регуляции транскрипции у бактерий». (25 мин)

М.А. ПЕТРОВА - зав. Сектором анализа и хранения микроорганизмов ЛМГМ ОМГК. «Плазмиды древних и современных природных штаммов *Acinetobacter* с генами устойчивости к стрептомицину/спектиномицину *AADA27*». (20 мин)

Дискуссия (10 мин)

23 июня, вторник

Утреннее заседание, начало в 10 часов

Председатель – В.З. Тарантул

А.А. АЛЕКСАНДРОВ - зав. Лабораторией биоинформатики. «Подходы к моделированию генетических и биохимических процессов». (25 мин)

Дискуссия (10 мин)

С.А. ЛИМБОРСКАЯ - зав. Отделом молекулярных основ генетики человека (ОМОГЧ). «Изучение действия лекарственных препаратов с позиций фармакогеномики». (30 мин)

П.А. СЛОМИНСКИЙ - зав. Лабораторией молекулярных основ наследственных заболеваний ОМОГЧ. «Изучение генетических факторов риска мультифакториальных заболеваний». (25 мин)

Дискуссия (10 мин)

А.А. ВОЛОДИН - зав. Лабораторией молекулярной биофизики. «Влияние ди- и мультикационных лигандов на реакцию обмена нитей ДНК в безбелковых системах». (25 мин).

Дискуссия (10 мин)

23 июня, вторник

Вечернее заседание, начало в 16 часов

Председатель – Е.Г. Пасюкова

В.З. ТАРАНТУЛ - руководитель Отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики (ОВКМГ). «Молекулярные механизмы, обеспечивающие противовирусное действие белка TRIM-14 и устойчивость клеток к повышенным концентрациям ионов марганца». (30 мин)

И.А. ГРИВЕННИКОВ - зав. Лабораторией молекулярной генетики соматических клеток ОВКМГ. «Регуляция процессов пролиферации, дифференцировки и функционирования соматических клеток млекопитающих с помощью генетических и химических факторов». (25 мин)

А.Г. КОБЫЛЯНСКИЙ – руководитель Центра клеточных и генных технологий (ЦКГТ). «Изучение влияния гиперэкспрессии фактора роста нервов (ФРН) и некоторых пептидов на способность эмбриональных стволовых (ЭС) клеток мыши дифференцироваться в нейральные и другие типы клеток *in vitro*». (20 мин)

В.В. ДЕМКИН - зав. Лабораторией молекулярной диагностики. «Изучение динамики изменений компонентов микробиот человека». (25 мин)

Дискуссия (10 мин)

24 июня, среда

Утреннее заседание, начало в 10 часов

Председатель – В.А. Гвоздев

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

С.И. ШРАМ – зав. Сектором нейрофармакологии ОХФАВ. «Поли(АДФ-рибоза)-полимераза-1 – перспективная мишень для кардио- и нейропротекторной терапии». (20 мин)

Дискуссия (10 мин)

Перерыв (15 мин)

С.В. КОСТРОВ - руководитель Отдела молекулярно-генетических основ биотехнологии и белковой инженерии (ОМГОБиБИ). «Поиск новых подходов к генной терапии онкологических заболеваний». (30 мин)

И.А. ХМЕЛЬ - зав. Лабораторией регуляции экспрессии генов микроорганизмов ОМГОБиБИ. «Химическая коммуникация бактерий и функциональная роль некоторых метаболитов (летучие органические соединения, цианотоксин ВМАА)». (25 мин)

К.В. СЕВЕРИНОВ – зав. Лабораторией регуляции экспрессии генов мобильных элементов прокариот. «Молекулярные механизмы CRISPR-Cas адаптации у *E. coli*». (25 мин)

Дискуссия (10 мин)

Заккрытие конференции

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

РНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ В ГЕРМИНАЛЬНЫХ И ПРИЛЕГАЮЩИХ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ В РАЗВИТИИ ЯИЧНИКОВ И СЕМЕННИКОВ ДРОЗОФИЛЫ

В.А. Гвоздев

Лаборатория биохимической генетики животных
Отдела молекулярной генетики клетки (ОМГК)

Продолжено исследование роли ядерного белка Piwi, связывающего короткие РНК (piРНК) и участвующего как в подавлении транспозонов в герминальных и окружающих их соматических клетках (клетки ниши), так и в процессах поддержания герминальных стволовых клеток (ГСК), а также в пролиферации и дифференцировке герминальных клеток. Клетки ниши участвуют как в поддержании герминальных стволовых клеток (ГСК), так и дифференцировке их потомков. Разные варианты системы piРНК подавляют транспозоны в соматических и герминальных клетках. Осуществляли выключение белков - участников биогенеза piРНК в соматических и герминальных клетках яичника избирательно с помощью тканеспецифичных нокдаунов или в обоих типах клеток с помощью мутаций. Мутации и нокдауны генов (*piwi*, *Yb*, *armi*, *zuc* и piРНК-кластера *flam*), нарушающих биогенез piРНК в соматических клетках яичников, приводили к формированию опухолеподобных структур, состоящих из подобных стволовым недифференцированных герминальных клеток. Обнаружено, что ранее охарактеризованная нами мутация, препятствующая транспорту Piwi в ядро и активирующая транспозоны, подавляет пролиферацию недифференцированных герминальных клеток. Таким образом, активация транспозонов в нише коррелирует с формированием пролиферирующих опухолевых структур герминальных клеток, тогда как в стволовых и недифференцированных герминальных клетках сопровождается противоположным эффектом.

Продолжено исследование функций белка Bel (РНК-хеликазы), не участвующего в репрессии транспозонов, в соматических и герминальных клетках семенников. Обнаружено

(с помощью мутаций и РНКи нокдаунов), что отсутствие или резкое снижение экспрессии *Bel* в герминальных клетках семенников, нарушающее их пролиферацию, связано с подавлением экспрессии генов митотических циклинов *A* и *B*. Предполагается, что *Bel* является регулятором экспрессии генов митотических циклинов. Экспрессия трансгена с геном циклина *B* частично восстанавливает пролиферацию герминальных клеток на фоне мутаций или нокдауна гена *bel*. Избирательный нокдаун *Bel* в соматических клетках с использованием двух разных генетических систем приводил к избыточной пролиферации недифференцированных герминальных клеток с образованием в семеннике опухолеподобных структур. Обнаруженные «противоположные эффекты» недостатка *Bel* в герминальных и соматических клетках выявляют двойственные функции (соответственно внутриклеточные и внешние, сигнальные) этого белка как регулятора клеточной пролиферации и дифференцировки герминальных клеток.

РОЛЬ ЯДЕРНОЙ ЛАМИНЫ В ПОДДЕРЖАНИИ СВЯЗИ ХРОМОСОМ С ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКОЙ

Ю.Я. Шевелев

Лаборатория анализа регуляции генов ОМГК

Ранее методом FISH мы показали, что при РНКи-нокдауне гена ламина *DmO* в клетках S2 дрозофилы происходит удаление двух районов неактивного хроматина (60D и 22A) от ядерной оболочки внутрь ядер (Shevelyov et al, 2009). Этот результат может быть объяснен утратой связи между определенными районами хромосом (ламина-ассоциированными доменами, ЛАДами) и ядерной ламиной после искусственного разрушения основного ее компонента – ламина *DmO*, что приводит к тотальному смещению хроматина внутрь ядер. Чтобы проверить эту гипотезу, было проанализировано положения хроматина *en masse* относительно ядерной оболочки в клетках S2 после искусственного снижения в них количества ламина *DmO*. Для визуализации хроматина и ядерной оболочки проводили иммуноокрашивание клеток антителами к гистону H4 и к ламин-

В-рецептору, соответственно. Анализ профилей интенсивности флуоресценции вдоль диаметров интерфазных ядер в программе Image J показал, что при разрушении ламина DmO в клетках S2 дрозофилы происходит увеличение среднего расстояния между хроматином и ядерной оболочкой. Это свидетельствует не просто о существовании контактов между хроматином и ламином, а о связывании определенных районов хромосом с ядерной ламиной и о том, что в норме хроматин растянут на ядерной ламине. Чтобы проверить вышеописанную модель с применением альтернативного подхода, был проведен РНКи-нокдаун гена ламина *DmO* в клетках S2, после чего клетки были подвергнуты процедуре Hi-C в лаборатории С.В. Разина (ИБГ РАН). Биоинформатический анализ был проведен в лаборатории М.С. Гельфанда (ИППИ РАН). Построенные карты хромосомных контактов показали, что при разрушении ядерной ламины неспецифически увеличивается число контактов между топологически ассоциированными доменами (ТАДами), что свидетельствует об увеличении плотности хроматина в ядре. Этот результат также подтверждает идею о том, что в норме хроматин растянут на ядерной ламине.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ КОНТРОЛЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ У ДРОЗОФИЛЫ

Е.Г. Пасюкова

Лаборатория геномной изменчивости ОМГК

В 2014 году работа лаборатории развивалась в нескольких направлениях.

Основное внимание в докладе будет уделено обобщению полученных за 2012-2014 годы результатов исследования роли гена *shaggy* и кодируемого им белка GSK3 beta в контроле продолжительности жизни. Интерес к этому гену вызван двумя причинами. Во-первых, мы предполагаем, что этот ген может играть ключевую роль в сопряжении различных метаболических и сигнальных путей, контролирующих продолжительность жизни. Во-вторых, белок GSK3 beta играет важную роль в развитии патологических состояний нервной системы. Ген *shaggy* образует 17 транскриптов, которым соответствуют 10 форм белка. Для исследования роли уровня экспрессии

различных форм GSK-3 beta в контроле продолжительности жизни используются полученные нами трансгенные линии мух с векторными конструкциями, содержащими соответствующие этим белкам кДНК. В работе используются также линии с мутациями в гене *sgg* и РНК-и нокадаун гена. Мы показали, что мутации гена, а также увеличение и снижение количества РНК, соответствующей основной форме белка, в нервной ткани, в частности, в мотонейронах и дофаминэргических нейронах, влияют на продолжительность жизни и зависимость от возраста локомоторную функцию. Начато изучение роли других форм белка в контроле продолжительности жизни. Было охарактеризовано влияние дополнительных копий трансгена, соответствующих основной форме белка, на морфологию нейромышечных контактов и активность синапсов. Были также охарактеризованы целостность цитоскелета нейромышечных связей (белки α Tubulin и Futsch). Предполагаемая митохондриальная дисфункция, вызванная гиперэкспрессией *shaggy*, была количественно оценена методами иммуногистохимического окрашивания. Исследовано влияние увеличения количества основной формы GSK3 beta на количество дофаминэргических нейронов.

Ранее в лаборатории была создана коллекция инбредных линий, полученных от мух, отловленных в природной популяции Александров. Была измерена их продолжительность жизни и описана структурная изменчивость регуляторной области гена *Lim3*, участвующего в контроле продолжительности жизни. В 2014 году, в рамках сотрудничества с европейским консорциумом по исследованию популяций дрозофилы (DrosEU) был продолжен сбор мух в российской популяции Александров, а также в новой популяции Валдай. Были заложены линии от самок, выловленных в этих популяциях, а также в популяциях Украины (Киев, Варва, Умань). Проводится инбридинг, необходимый для дальнейшей работы с линиями.

В 2014 году были также продолжены работы по исследованию мишеней белка, кодируемого геном *Lim3*, и роли уровня экспрессии гена *shuttle craft* в контроле продолжительности жизни.

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

1. Klenov M.S., Lavrov S.A., Korbut A.P., Stolyarenko A.D., Yakushev E.Y., Reuter M., Pillai R.S., Gvozdev V.A. Impact of nuclear Piwi elimination on chromatin state in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42:6208-6218.
2. Shpiz S., Lavrov S., Kalmykova A. Combined RNA/DNA fluorescence *in situ* hybridization on whole-mount *Drosophila* ovaries. *Methods Mol. Biol.* 2014, 1093, 161-169.
3. Shpiz S., Ryazansky S., Olovnikov I., Abramov Y., Kalmykova A. Euchromatic transposon insertions trigger production of novel pi- and endo-siRNAs at the target sites in the *Drosophila* germline. *PLoS Genet.* 2014, 10:e1004138.
4. Roshina N.V., Symonenko A.V., Kremntsova A.V., Trostnikov M.V., Pasyukova E.G. Embryonic expression of *shuttle craft*, a *Drosophila* gene involved in neuron development, is associated with adult lifespan. *Aging (Albany NY).* 2014, 6:1076-1093.
5. Moskalev A.A., Pasyukova E.G. From theories of aging to anti-aging interventions. *Front.Genet.* 2014, 5:276.
6. Коган Г.Л., Гвоздев В.А. Многофункциональный белковый комплекс NAC (nascent polypeptide associated complex). *Молекулярная биология.* 2014, 48:223-231.
7. Котов А.А., Акуленко Н.В., Кибанов М.В., Оленина Л.В. РНК-хеликазы, содержащие DEAD-бок, в процессах гаметогенеза у животных. *Молекулярная биология.* 2014, 48:22-35.
8. Носов Г.А., Кибанов М.В., Оленина Л.В. Динамические характеристики герминальной гранулы piNG тельца в семенниках *Drosophila melanogaster*. *Молекулярная биология.* 2014, 48:805-813.
9. Веселкина Е.Р., Рыбина О.Ю., Симоненко А.В., Алаторцев В.Е., Рощина Н.В., Пасюкова Е.Г. Молекулярная изменчивость гена *Lim3*, регулирующего развитие нервной системы, в географически отдаленных популяциях *Drosophila melanogaster*. *Генетика.* 2014, 50:629-637.
10. Тростников М.В., Рощина Н.В., Симоненко А.В., Муха Д.В., Пасюкова Е.Г. Молекулярно-генетическая модель таупатии на основе сверхэкспрессии протеинкиназы GSK3 β в нервной системе *Drosophila melanogaster*. В: Нейродегенеративные

заболевания. От генома до целостного организма, Угрюмов М.В. (ред.), Научный Мир. Москва. 2014, 2, 453-463.

РОЛЬ ТЕЛОМЕРНОГО КОМПЛЕКСА В РАННЕМ РАЗВИТИИ *DROSOPHILA*

А.И. Калмыкова

Лаборатория исследования геномных повторов эукариот

Исследование роли теломерного комплекса в процессе оогенеза и в раннем развитии важно для понимания механизмов, обеспечивающих контроль целостности генетической информации. На ранней стадии развития, до активации зиготической транскрипции, важную роль играют РНК и белки, которые передались с цитоплазмой ооцита, т.е. герминальные компоненты. Используя *Drosophila*, как модельный объект, мы исследуем особенности теломерного комплекса в герминальных тканях самок и его роль в раннем развитии. Основные данные о теломерном комплексе дрозофилы получены на соматических тканях. Мы показали, что герминальный теломерный комплекс обладает особой структурой, т.к. в его формировании участвует система коротких РНК, Piwi-interacting RNA (piРНК), специфичная для гонад животных. Чтобы выявить другие компоненты герминального теломерного комплекса, мы провели выборочный скрининг кандидатных генов. Показателем нарушения теломерного хроматина служила гиперэкспрессия теломерного повтора, *HeT-A*. Такой подход был основан на том факте, что при нарушении работы некоторых теломерных факторов в соматических тканях происходит гиперактивация экспрессии *HeT-A*. Мы показали, что для сайленсинга теломерных повторов в яичниках необходимы следующие компоненты: транскрипционные факторы Woc и Trf2, РНК-связывающий белок Ars2, деаденилазный комплекс Ccr4-Not. Затем мы посмотрели, как влияет нарушение работы перечисленных факторов на ранние стадии эмбриогенеза, и показали, что при этом происходят различные митотические нарушения, такие, как нерасхождения хромосом, образование теломерных мостиков, нарушения полярности веретена деления, дисфункция центросом. Все это приводит к повышенному уровню летальности эмбрионов. Таким образом,

материнские компоненты теломерного хроматина необходимы для защиты теломер на ранних стадиях эмбриогенеза. Их отсутствие приводит к слияниям теломер и выбраковке таких ядер. Наконец, мы проследили за теломерными транскриптами, которые накапливаются в яичниках и транспортируются в эмбрион. Было обнаружено, что при нарушении работы теломерных факторов избыточные транскрипты *HeT-A* локализуются вблизи centrosом, центров организации микротрубочек. Мы предполагаем, что теломерные транскрипты могут играть роль в разрушении митотического аппарата при дисфункции теломер. Этот процесс может обеспечить уничтожение ядер с измененным числом хромосом вследствие нарушения сборки теломерного защитного комплекса. Наши данные позволяют по-новому взглянуть на возможные функции теломерных РНК-консервативных компонентов теломер, недавно обнаруженных у всех изученных организмов.

Публикации Лаборатории исследования геномных повторов эукариот:

1. Shpiz S., Kalmykova A., Analyses of piRNA-mediated transcriptional transposon silencing in *Drosophila*: Nuclear run-on assay on ovaries. *Methods in Molecular Biology*. 2014, 1093, 149-160.
2. Shpiz S., Lavrov S., Kalmykova A. Combined RNA/DNA fluorescence in situ hybridization on whole mount *Drosophila* ovaries. *Methods in Molecular Biology*. 2014, 1093, 161-169.
3. Olovnikov I., Le Thomas A., Aravin A.A. A framework for piRNA cluster manipulation. *Molecular Biology*. 2014, vol. 1093, 45-58.
4. Shpiz S., Ryazansky S., Olovnikov I., Abramov Y., Kalmykova A. Euchromatic transposon insertions trigger production of novel pi- and endo-siRNAs at the target sites in the *Drosophila* germline, *PLOS Genetics*. 2014, 10:e1004138.
5. Hur JK, Olovnikov I, Aravin AA Prokaryotic Argonautes defend genomes against invasive DNA. *Trends Biochem Sci.*, 2014, 39:257-259.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ И МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ У БАКТЕРИЙ

А.В. Кульбачинский

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов ОМГК

Несмотря на консервативное строение и общий механизм работы, РНК-полимеразы (РНКП) различных бактерий могут значительно различаться по своим каталитическим свойствам и особенностям регуляции активности, что имеет адаптивное значение. *Deiococcus radiodurans* – уникальная бактерия, устойчивая к действию исключительно высоких доз радиации, а также к другим ДНК-повреждающим воздействиям. Целью нашей работы является изучение особенностей структуры и функций РНКП *D. radiodurans*. Установлено, что данная РНКП обладает важными отличиями от хорошо исследованной РНКП *Escherichia coli*. В частности, она образует нестабильные промоторные комплексы и обладает гораздо большей РНК-расщепляющей активностью на стадии элонгации транскрипции. Нами выявлены участки фермента, ответственные за данные отличия и предположена их роль в катализе различных реакций в активном центре РНКП. Данные особенности РНКП *D. radiodurans* могут иметь значение для транскрипции поврежденной ДНК в клетке.

Важной задачей работы является изучение механизмов регуляции активности РНКП *D. radiodurans* транскрипционными факторами. Существенную роль в транскрипции в условиях стресса могут играть Gre-белки, которые стимулируют реакцию расщепления РНК в активном центре РНКП. В клетках экстремофильных бактерий *Deinococcus-Thermus* обнаружены гомологи Gre-факторов – белки Gfh, функции которых неизвестны. Нами показано, что данные факторы способны ингибировать каталитическую активность РНКП *D. radiodurans* на разных стадиях транскрипции, причем их действие зависит от ионов двухвалентных металлов. Так как ионный состав цитоплазмы клеток *D. radiodurans* значительно изменяется при стрессе, это может являться механизмом избирательного подавления транскрипции в стрессовых условиях.

ПЛАЗМИДЫ ДРЕВНИХ И СОВРЕМЕННЫХ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ *ACINETOBACTER* С ГЕНАМИ УСТОЙЧИВОСТИ К СТРЕПТОМИЦИНУ/СПЕКТИНОМИЦИНУ *AAD*A27

М.А. Петрова

Сектор анализа и хранения микроорганизмов (ЛМГМ ОМГК)

В 2014 году продолжено изучение мобильных элементов древних и современных штаммов природных бактерий, участвующих в горизонтальном переносе генов устойчивости к антибиотикам и солям тяжелых металлов. Работа велась по двум основным направлениям: изучение плазмид, несущих гены устойчивости, из древних штаммов *Acinetobacter lwoffii* и исследование распространения генов интегразы 1 класса в современных и древних природных экосистемах, не подвергавшихся активному антропогенному воздействию.

Получены предварительные данные, указывающие на ошибочность недавно высказанного предположения (Gillings et al., 2014) о том, что гены интегразы 1 класса не встречаются в чистых экосистемах и могут служить индикатором антропогенного воздействия на окружающую среду.

Проведена ручная сборка плазмид из контигов, полученных при полногеномном секвенировании трех древних штаммов *A. lwoffii*, выделенных из многолетнемерзлых отложений возрастом от 20 тыс до 3 млн лет. Всего удалось собрать 18 плазмидных геномов размером от 4 до 287 тпн. При их анализе в двух штаммах были выявлены 2 абсолютно идентичные мелкие плазмиды размером 4135 пн, содержащие новый вариант гена устойчивости к стрептомицину и спектиномицину *aadA27*. Кроме гена *aadA* в состав плазмиды, обозначенной pALWED1.8, входят гены *mobA* и *mobC*, отвечающие за ее мобилизацию конъюгативными плазмидами и 3 гипотетические открытые рамки считывания (ОРС). В специальных опытах было показано, что гены *mobA* и *mobC* являются функционально активными и способны обеспечивать мобилизацию pALWED1.8 при конъюгации с частотой $2,3 \times 10^{-3}$. Нуклеотидные последовательности *mobA* и *mobC* схожи с генами мобилизации (81% идентичных нп) современной плазмиды pRAY, широко распространенной среди патогенных штаммов *Acinetobacter*. В отличие от pALWED1.8, pRAY и все известные родственные ей плазмиды содержат ген *aadB*, который обеспечивает

устойчивость одновременно к гентамицину, канамицину и тобрамицину. Среди имеющихся в GenBank контигов, полученных при полногеномном секвенировании штаммов *Acinetobacter* различных видов, были обнаружены еще шесть к настоящему моменту не выявленных вариантов плазмид, родственных pALWED1.8 и pRAY, образующих ранее неизвестную подгруппу плазмид.

Мелкие плазмиды, практически идентичные pALWED1.8, были выявлены также в 6 из 43 исследованных штаммов *Acinetobacter*, из ранее созданной нами коллекции природных бактерий: пяти древних и современных штаммах *A. Iwoffii*, а также в современном штамме *A. johnsonii*.

Обнаружено, что в отличие от большинства описанных вариантов гена *aadA*, которые являются кассетными и входят в состав интегронов, ген *aadA27*, входящий в состав плазмиды pALWED1.8, является не кассетным (автономным) и имеет собственный промотор. Проведенный нами анализ показал, что не кассетные гены, последовательности которых на 96% схожи с *aadA27*, входят в состав хромосом *A. gyllenbergii* и двух штаммов *Acinetobacter* sp. При расширенном биоинформатическом анализе было впервые обнаружено, что автономные гены *aadA* входят в состав геномов грамположительных и грамотрицательных бактерий. В нескольких случаях автономные гены *aadA* были обнаружены на плаزمидах, не родственных pALWED1.8. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей белков, кодируемых выявленными нами и ранее известными вариантами гена *aadA*, показал, что (1) хромосомные не кассетные гены *aadA* могут наследоваться как вертикально, так и передаваться путем горизонтального переноса, что подтверждается и их обнаружением в составе плазмид; (2) кассетные гены *aadA* образуют отдельную монофилетическую группу, что указывает на их происхождение от хромосомного гена или нескольких генов, принадлежащих близкородственным бактериям.

**Публикации Лаборатории молекулярной генетики
микроорганизмов ОМГК:**

1. Makarova A.V., Ignatov A., Miropolskaya N., Kulbachinskiy A. Roles of the active site residues and metal cofactors in noncanonical base-pairing during catalysis by human DNA polymerase ι . *DNA Repair (Amst)*. 2014, 22: 67-76.
2. Basu R.S., Warner B.A., Molodtsov V., Pupov D., Esyunina D., Fernández-Tornero C., Kulbachinskiy A., Murakami K.S. Structural basis of transcription initiation by bacterial RNA polymerase holoenzyme. *J. Biol. Chem.* 2014, 89: 24549-24559.
3. Tagami S., Sekine S., Minakhin L., Esyunina D., Akasaka R., Shirouzu M., Kulbachinskiy A., Severinov K., Yokoyama S. Structural basis for promoter specificity switching of RNA polymerase by a phage factor. *Genes Dev.* 2014, 28: 521-531.
4. Pupov D., Kuzin I., Bass I., Kulbachinskiy A. Distinct functions of the RNA polymerase σ subunit region 3.2 in RNA priming and promoter escape. *Nucl. Acids Res.* 2014, 42: 4494-4504.
5. Miropolskaya N., Esyunina D., Klimašauskas S., Nikiforov V., Artsimovitch I., Kulbachinskiy A. An interplay between the trigger loop and the F loop during RNA polymerase catalysis. *Nucl. Acids Res.* 2014, 42: 544-552.
6. Petrova M, Shcherbatova N, Kurakov A, Mindlin S. Genetic structure and biological properties of the first ancient multiresistance plasmid pKLH80 isolated from a permafrost bacterium. *Microbiology-SGM.* 2014, 160: 2253-2263.
7. Petrova M, Shcherbatova N, Kurakov A, Mindlin S. Genomic characterization and integrative properties of ϕ SMA6 and ϕ SMA7, two novel filamentous bacteriophages of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Arch Virol.* 2014, 159: 1293-1303.

ПОДХОДЫ К МОДЕЛИРОВАНИЮ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

А.А. Александров

Лаборатория биоинформатики

Анализ альфа-сателлитов гиббона

Проанализирована геномная сборка гиббона *N. leucogenys* (Nleu3.0). Гиббон интересен тем, что он занимает промежуточное положение на эволюционной лестнице между обезьянами Старого Света, у которых, как считается, отсутствуют повторяющиеся единицы высокого порядка (ПЕВП), и гоминидами, у которых такие ПЕВП формируют живые центромеры. У *N. leucogenys* найдены контиги, содержащие альфа-сателлиты (АС). Построена карта ортологий с геномом человека для хромосомы X на основе контигов. Эта карта подтвердила подобную карту, составленную нами ранее по не объединенным в контиги сиквенсам, что говорит о том, что предложенный ранее метод работает. Наряду с мономерным АС обнаружены фрагменты, заключающие в себе ПЕВП. Таких единиц найдено две: 9-мер и 14-мер. Позднее 9-мерная ПЕВП была подтверждена независимым сиквенсом (Koga *et al.*, 2014). 14-мер содержит внутренний повтор из трех мономеров, описанный нами ранее (Shepelev *et al.*, 2009). Наблюдение двух ПЕВП интересно в связи с тем, что цитогенетики обнаружили локализацию АС у *N. leucogenys* не только в центромерах, но и в теломерах, а также в промежуточных участках некоторых хромосом (Baicharoen *et al.*, 2014). Была выдвинута гипотеза, что одна из ПЕВП соответствует теломерам, а другая – центромерам. Однако, проверить эту гипотезу не просто, так как найденные единицы близкородственны. Один из подходов - использовать олигонуклеотидные зонды. Для этого были выявлены участки высокого сходства и контрастные. Найдены специфичные олигонуклеотидные зонды, которые могут быть использованы для гибридизации *in situ*. На основе гибридизации *in silico* подсчитано, что 9-мер занимает 30%, а 14-мер - 7% АС.

Математическое моделирование процессов метаболизма живой клетки

Проведено поэтапное построение полной математической модели метаболизма (при условии оптимального использования субстрата) в клетке *Sacharamyces cerevisiae*, растущей на

сахаре в аэробном режиме, на основе ранее собранных и скорректированных данных о распределении метаболических процессов по её структурным компартментам (ядро, цитоплазма, митохондрия, эндоплазматический ретикулум, пероксисома, аппарат Гольджи, вакуоль) и их взаимодействии.

Построенная модель позволяет производить расчет скоростей практически всех основных ферментативных реакций, происходящих в клетке на стадии стационарного роста (включая реакции транспорта между компартментами), по экспериментальным данным о материальном обмене между клеткой и средой.

В отчетном году разработана компьютерная программа, позволяющая проводить расчёт распределения скоростей ферментативных реакций в заданной полиферментной системе клетки, если имеются экспериментальные данные по скоростям материального обмена этой клетки с внешней средой.

Разработанная программа была применена для расчета распределения скоростей реакций в метаболической системе клетки *E.coli*, растущей на глюкозе в аэробных условиях. Для проведения расчета были использованы имеющиеся данные литературы о скоростях материального обмена клетки *E.coli* со средой на стадии стационарного роста в хемостате.

Анализ полученных результатов показал, что реакции внутриклеточного метаболизма разделяются на две группы. Скорость каждой реакции 1-ой группы (это около трех четвертей реакций) однозначно определяется экспериментально измеренными скоростями материального обмена клетки со средой. К 1-ой группе относится подавляющее большинство метаболических реакций. Оставшиеся реакции образуют несколько подгрупп, для каждой из которых однозначно определяется только сумма скоростей, входящих в эту подгруппу реакций.

Публикации Лаборатории биоинформатики:

1. Fedoseyeva V, Zharinova I, Alexandrov A. Secondary structure-stretched forms of long intron RNA products from the view point of initiation of chromosome homologs somatic pairing. *J Biomol Struct Dyn*. 2014, May 20:1-8.
2. Федосеева В. Б. Теоретическая оценка нуклеосомной плотности на генных последовательностях различных ортологов при

эухроматической и гетерохроматической локализации. Математическая биология и биоинформатика. 2014, 9, вып.1, 273-285.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПОЗИЦИЙ ФАРМАКОГЕНОМИКИ

С.А. Лимборская

Отдел молекулярных основ генетики человека (ОМОГЧ)

Имеющиеся клинические данные свидетельствуют о том, что онкологические больные азиатского происхождения хуже переносят химиотерапию препаратами платины в сравнении с пациентами-европейцами. С целью изучения вклада популяционно специфических особенностей отдельных полиморфных вариантов в эти различия нами было исследовано 228 полиморфизмов в 106 генах, задействованных в метаболизме ксенобиотиков, репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптозе, у больных раком яичников женщин русской и якутской этнических групп, получавших химиотерапию на основе цисплатина. Ассоциации с клиническими параметрами лечения (частотой ремиссий, выживаемостью и побочными действиями) продемонстрировали полиморфные локусы 21 гена. Все обнаруженные ассоциации между полиморфизмами и теми или иными результатами химиотерапии были специфичны для каждой из этнических групп. Это позволяет предполагать наличие этноспецифических особенностей в молекулярных механизмах реакций, определяющих чувствительность пациентов к действию препаратов платины.

В условиях экспериментальной фокальной ишемии мозга крыс обнаружен иммуномодулирующий эффект семакса, а также его воздействие на экспрессию генов, обеспечивающих формирование и функционирование сосудистой системы. С использованием полногеномных чипов Illumina Rat Ref-12 (22226 генов по данным NCBI) проведен анализ ответа транскриптома ишемизированных тканей коры головного мозга крыс на воздействие пептидного препарата семакс. В условиях ишемии пептид воздействует на целый ряд биологических процессов, способствующих функционированию различных систем организма. Из числа генов иммунного ответа,

изменивших экспрессию под воздействием семакса, наиболее заметные группы составили гены иммуноглобулинов и хемокинов. В условиях фокальной ишемии мозга крыс семакс также оказал воздействие на экспрессию генов, обеспечивающих формирование и функционирование сосудистой системы. Возможно, обнаруженные эффекты являются ключевыми звеньями нейропротективного действия препарата.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РИСКА МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

П.А. Сломинский

Лаборатория молекулярных основ наследственных
заболеваний ОМОГЧ

Параганглиома – преимущественно доброкачественное новообразование, развивающееся из ассоциированных с симпатическими и парасимпатическими ганглиями клеток параганглиев, расположенных в области аурикулярной ветви блуждающего нерва, барабанного нерва, луковицы яремной вены. По характеру наследования различают семейную форму (АД тип наследования) параганглиомы и спорадическую, при этом на долю семейной формы приходится по разным оценкам 10-50% от общего числа случаев заболевания. В настоящее время идентифицирован ряд генов, мутации в которых приводят к развитию заболевания. Наиболее часто при параганглиоме встречаются мутации в гене *SDHD*, кодирующем субъединицу D сукцинатдегидрогеназного комплекса. В связи с этим на первом этапе изучения генетических причин развития параганглиомы в российской популяции нами было проведено ресеквенирование гена *SDHD* у 76 пациентов с параганглиомами различной локализации (основание черепа, шея, область яремной впадины и др.). Всего было выявлено 5 пациентов с мутациями в гене *SDHD*, что составляет 6,5% от общего числа исследованных больных. Среди них есть как встречавшиеся ранее мутации (*His102Arg* и *Tyr114Cys*), так и мутация *Thr105Stop*, обнаруженная впервые. Наиболее частой оказалась мутация *His102Arg*, ранее описанная Roerpel et al. (2011) у пациента из США - она выявлена у 3 больных. Анализ семей пациентов с

мутациями в гене SDHD выявил 2 носителей мутации His102Arg, у которых пока не обнаружено клинических проявлений параганглиомы.

Хорошо известно, что в настоящее время ДНК идентификация личности основана на анализе полиморфизма коротких простых маркеров и разработан ряд панелей STR маркеров. Однако при высокой информативности STR маркеров этот метод не лишен ряда недостатков технического характера и в качестве альтернативы может быть предложен анализ однонуклеотидных полиморфных вариантов или SNV. Возникает вопрос об информативности таких маркеров. Для решения этого вопроса нами был проведен анализ их мощности с использованием данных, полученных ранее при типировании SNV ДНК маркеров в российской популяции с использованием панели HumanCyto SNP v. 12. В итоге было показано, что для однозначной идентификации личности достаточно относительно небольшого числа SNV ДНК маркеров - при условии, что в число таких маркеров будут включены ДНК маркеры с частотой минорного аллеля более 0.3.

Публикации Отдела молекулярных основ генетики человека:

1. Alieva A.Kh., Shadrina M.I., Filatova E.V., Karabanov A.V., Illarioshkin SN., Limborska S.A., Slominsky P.A. Involvement of endocytosis and alternative splicing in the formation of the pathological process in the early stages of Parkinson's disease. Biomed Res Int. 2014; 2014:718732.
2. Gusev A, Lee S.H., Trynka G., Finucane H., Vilhjálmsson B.J., Xu H., Zang C., Ripke S., Bulik-Sullivan B., Stahl E. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium; SWE-SCZ Consortium, Kähler AK, Hultman CM, Purcell SM, McCarroll SA, Daly M, Pasaniuc B, Sullivan PF, Neale BM, Wray NR, Raychaudhuri S, Price AL et al. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium; SWE-SCZ Consortium. Partitioning heritability of regulatory and cell-type-specific variants across 11 common diseases. Am J Hum Genet. 2014, 95(5):535-52.
3. Ripke S., Khrunin A.V., Limborska S.A., O'Donovan MC. et al. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. Nature, 2014, vol. 511, 7510: 421-427.

4. Medvedeva E.V., Dmitrieva V.G., Povarova O.V., Limborska S.A., Skvortsova V.I., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. The peptide semax affects the expression of genes related to the immune and vascular systems in rat brain focal ischemia: genome-wide transcriptional analysis. *BMC Genomics*. 2014, 15(1):228.
5. Khrunin A.V., Khokhrin D.V., Moisseev A.A., Gorbunova V.A., Limborska S.A. Pharmacogenomic assessment of cisplatin-based chemotherapy outcomes in ovarian cancer. *Pharmacogenomics*. 2014, 15(3):329-37.
6. Спицына Н.Х., Макаров С.В., Бец Л.В., Лимборская С.А., Карапетян М.К., Бычковская Л.С., Пай Г.В., Алексеева Н.В., Спицын В.А. Новая информация о генофонде восточных хантов. *Вестник Московского государственного университета*. 2014, Серия XXIII Антропология, 4, 101-106.
7. Филатова Е. В., Шадрин М. И., Алиева А. Х., Колачева А. А., Сломинский П. А., Угрюмов М. В. Анализ экспрессии генов убиквитин-протеасомной деградации белков при моделировании ранних стадий МФТИ-индуцированной болезни Паркинсона у мышей. *Доклады академии наук*. 2014, 456, 6, 728–730.
8. Филиппова И.Н., Хрунин А.В., Лимборская С.А. Анализ делеций гена *GSTM1* в контексте гаплотипического разнообразия геномного кластера *GSTM* в трех русских популяциях. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2014, 2, 8-11.
9. Рожкова А.В., Зиновьева М.В., Сасс А.В., Зборовская И.Б., Лимборская С.А., Дергунова Л.В. Различающийся характер экспрессии гена сфингомиелинсинтазы 1 (*SGMS1*) человека в опухолях легкого и пищевода. *Молекулярная биология*. 2014, 48, 3, 395-402.
10. Медведева Е.В., Дмитриева В.Г., Поварова О.В., Лимборская С.А., Скворцова В.И., Мясоедов Н.Ф., Дергунова Л.В. Трипептид ProGlyPro влияет на транскриптом коры головного мозга крыс в условиях фокальной ишемии. *Молекулярная биология*. 2014, 48(2): 277-287.
11. Филатова Е.В., Алиева А.Х., Шадрин М.И., Шульская М.В., Федотова Е.Ю., Иллариошкин С.Н., Лимборская С.А., Сломинский П.А. Анализ мутаций у пациентов с предполагаемой аутосомно-доминантной формой болезни Паркинсона. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2014, 1, 3-4.

12. Аполихин О.И., Сивков А.В., Константинова О.В., Тупицына Т.В. П.А. Сломинский. Ассоциация мочекаменной болезни у пациентов с различными состояниями семейного анамнеза по уролитиазу с полиморфизмами его кандидатных генов в российской популяции. Экспериментальная и клиническая урология. 2014, 3, 50-52.

ВЛИЯНИЕ ДИ- И МУЛЬТИКАТИОННЫХ ЛИГАНДОВ НА РЕАКЦИЮ ОБМЕНА НИТЕЙ ДНК В БЕЗБЕЛКОВЫХ СИСТЕМАХ

А.А. Володин

Лаборатория молекулярной биофизики

Основным направлением работы Лаборатории в настоящее время является изучение реакции обмена нитей ДНК при взаимодействии с низкомолекулярными лигандами различной химической природы. Цель этой работы состоит в выяснении, насколько общей является способность стимулировать реакцию обмена среди низкомолекулярных лигандов разных классов и сравнении механизмов реакции обмена для комплексов ДНК с разными низкомолекулярными лигандами и в составе нуклеобелковых филаментов, активных в гомологичной рекомбинации.

В прошедшем году было проведено детальное изучение способности стимулировать реакцию обмена нитей нескольких ионов двухвалентных металлов разных химических групп. Показано, что большинство изученных лигандов этого типа проявляет способность существенно ускорять реакцию обмена. При этом, в отличие от случая комплексов ДНК с ионами магния, охарактеризованного нами ранее, ионы некоторых металлов стимулируют реакцию обмена, дестабилизируя при этом ДНК дуплекс против тепловой денатурации. Это подтверждает наше предположение об отсутствии корреляции между скоростью реакции обмена и стабильностью ДНК дуплексов и позволяет рассматривать реакцию обмена как относительно самостоятельную молекулярную активность ДНК.

Продолжено изучение влияния на реакцию обмена нитей мультикаationных лигандов разной валентности, представляющих разные классы химических соединений, включающих координационные комплексы металлов (гексамин кобальта), алифатические полиамины (спермин и спермидин), интеркалирующие красители (хлорохин) и вещества амфифильной природы (производные 1,3 диазаадамантиана). Большинство таких лигандов обладает способностью вызывать межмолекулярную агрегацию ДНК. Для случаев нескольких лигандов показано, что высокая степень агрегации может приводить к аномальным особенностям или полному подавлению реакции обмена. В то же время, умеренная степень межмолекулярной агрегации может происходить в условиях, благоприятных для реакции обмена. Ведётся дальнейшее изучение роли этого фактора в реакции обмена.

Известно, что в рекомбинационных нуклеопротеидных комплексах происходят как локальные нарушения двойной спирали, так и интенсивная межмолекулярная агрегация нитей ДНК. Наши данные показывают, что и в безбелковых системах могут действовать оба этих фактора.

Публикации Лаборатории молекулярной биофизики:

1. Pezza R.J., Voloshin O.N., Volodin A.A., Boateng K.A., Bellani M.A., Mazin A.V., Camerini-Otero R.D. The dual role of HOP2 in mammalian meiotic homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42(4):2346-2357.
2. Мамаева О.К., Габриелян А.Г., Арутюнян Г. Л., Бочарова Т. Н., Смирнова Е. А., Володин А. А., Щелкина А. К., Калюжный Д. Н. Индуцирование межмолекулярной ассоциации ДНК амфифильными производными 1,3 диазаадамантиана с гидрофобными боковыми цепями. *Молекулярная биология.* 2014, 48, 850–858.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ АНТИВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ БЕЛКА TRIM-14 И УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК К ПОВЫШЕННЫМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ ИОНОВ МАРГАНЦА

В.З. Тарантул

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

Ранее нами была обнаружена повышенная экспрессия гена *trim-14* в лимфомах ВИЧ-инфицированных людей и ОБИ-инфицированных обезьян. Для выяснения причины усиления экспрессии этого гена нами были получены эмбриональные стволовые клетки мыши (mESC) и эмбриональные клетки почеч человека (линия HEK293), трансфецированные этим геном. С помощью вычитающей гибридизации было установлено, что повышенная экспрессия белка TRIM-14 индуцирует в обоих типах этих клеток экспрессию около десятка генов, многие из которых кодируют белки, имеющие прямое отношение к работе врожденной иммунной системы. В дальнейших экспериментах с использованием вируса Синдбис было показано, что в трансфецированных *trim-14* клетках размножение этого вируса через 24 часа после инфекции резко снижалось (на 3-4 порядка) по сравнению с контрольными клетками. С помощью ПЦР в реальном времени мы проанализировали экспрессию 43 известных генов, которые участвуют в механизмах врожденной иммунной системы. 18 из этих генов повышали уровень экспрессии как в *trim-14* трансфецированных клетках, так и в контрольных клетках, зараженных вирусом Синдбис. В дальнейшем (через 48 часов после инфекции) в *trim-14* трансфецированных клетках происходило резкое понижение экспрессии большинства этих генов, а титр вируса в них повышался.

Нами ранее было выдвинуто предположение о том, что генотоксический эффект ионов марганца при таких патологиях как манганизм и паркинсонизм может быть вызван усилением некорректной активности ДНК-полимеразы йота (Pol ϵ) в присутствии повышенных концентраций марганца. Для проверки этого предположения мы получили клетки SKOV-3 (клетки аденокарциномы яичника человека), устойчивые к повышенным концентрациям ионов марганца (до 400 мкМ), и изучили в них

активность фермента Pol α . Полученные клетки отличались от клеток исходной линии измененной морфологией и пониженной скоростью роста при физиологических концентрациях ионов марганца. Однако активность Pol α в них практически не менялась. Для выяснения возможного молекулярного механизма, с помощью которого клетки становятся устойчивыми к повышенным концентрациям ионов марганца и нейтрализуют повышенную некорректную активность Pol α , мы изучили в них активность фермента PARP-1 [poly(ADP-ribose)polymerase], который отвечает за ликвидацию повреждений, возникающих в ДНК. Оказалось, что активность PARP-1 в клетках, устойчивых к марганцу, примерно в два раза выше, чем в исходных. Кроме того, в них в меньшей степени ингибируется ионами марганца активность PARP-1, индуцированная перекисью водорода. Таким образом, можно предположить, что повышенная активность PARP-1 в клетках, устойчивых к высоким концентрациям марганца, позволяет этим клеткам ликвидировать повреждения ДНК, которые генерирует Pol α при высоких концентрациях ионов марганца, и, тем самым способствует их выживаемости в данных нефизиологических условиях.

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

И.А. Гривенников

Лаборатория молекулярной генетики соматических клеток
ОВКМГ

Продолжены работы по характеристике индуцированных плюрипотентных стволовых (ИПС) клеток от пациентов, страдающих наследственной формой болезни Паркинсона.

Был проведен полногеномный транскриптомный анализ нейрональных культур, дифференцированных из ИПС клеток от двух пациентов с мутацией в гене *PARK8*, одного пациента с мутацией в гене *PARK2* и здорового донора. В мутантных

клетках (не зависимо от типа мутации) на 34 день дифференцировки в нейральном направлении была повышена экспрессия гена *SNCA*, кодирующего α -синуклеин, белок являющийся основным компонентом телец Леви. В нейронах, несущих мутацию в гене *PARK2*, на 34 день дифференцировки повышается по сравнению с немутантными нейронами экспрессия 65 генов, продукты которых участвуют в клеточном метаболизме и работе митохондрий (гены ферментов цикла Кребса, ферментов метаболизма жирных кислот, некоторые транспортные РНК). Были получены ИПС клетки от здорового донора двумя методами, с помощью лентивирусных векторов (интеграционный метод) и с помощью векторов, основанных на вирусе Сендай (не интеграционный метод). Для того, чтобы ответить на вопрос, влияет ли выбор метода индукции плюрипотентности на качество получаемых ИПС клеток и на глубину репрограммирования, был проведен полногеномный анализ метилирования ДНК в ИПС клетках, полученных из материала этого донора разными методами. Было показано, что паттерн метилирования ДНК одинаков во всех полученных нами линиях ИПС клеток. Кроме того, все исследованные линии ИПС клетки были сходны и с эмбриональными стволовыми клетками человека по паттерну метилирования ДНК. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что метод индукции плюрипотентности не влияет на полноту репрограммирования получаемых ИПС клеток.

На основе ИПС клеток человека разработана тест – система для оценки цитотоксичности и эмбриотоксичности различных химических соединений. Тестирование соединений проводилось на недифференцированных ИПС клетках, на стадии формирования эмбриоидных тел, а также оценивались их эффекты на способность клеток формировать производные трех зародышевых листков: эктодермы, мезодермы и энтодермы. Все сформированные ЭТ погибали к 3-4 дню культивирования. Показано, что исследуемые соединения не влияют на спонтанную дифференцировку клеток всех зародышевых листков.

Обнаружена способность эндогенных меланокортинов: АКТГ(4-10) и α -меланоцит стимулирующий гормон (α -МСГ, АКТГ(1-13)) регулировать уровень кортикостерона, но не провоспалительного цитокина TNF- α в крови крысы при системном введении бактериального эндотоксина. Показано,

что данная регуляция осуществляется при участии 3-го подтипа меланокортиновых рецепторов. В воспалительной модели депрессии (системное введение бактериального эндотоксина) обнаружено ослабление выраженности основного симптома депрессии - ангедонии у крыс при системном введении эндогенного меланокортина АКТГ(4-10), но не его клинически применяемого аналога Семакса. В совокупности с данными об эффектах этих пептидов в стрессовой модели депрессии, полученные результаты указывают на наличие у эндогенных меланокортинов антидепрессантной активности.

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

1. Nenasheva V.V., Kovaleva G.V., Khaidarova N.V., Novosadova E.V., Manuilova E.S., Antonov A.A., Tarantul V.Z. Trim14 overexpression causes the same transcriptional changes in mouse embryonic stem cells and human HEK293 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 2014, 50, 2, 121-128.
2. Freitas V. J. F., Serova I. A., Andreeva L. E. et al. The comparison of two embryo donor breeds for the generation of transgenic goats by DNA pronuclear microinjection. *Animal Production Science*., 2014. 54(5) 564-568.
3. Freitas V.J.F., Melo L.M1, Batista RITP, Souza-Fabjan J.M.G., Teixeira D.I.A., Serova I.A., Andreeva L.E., Burkov I.A., Serov O.L. Goats (*Capra hircus*) as Bioreactors for Production of Recombinant Proteins Interesting to Pharmaceutical Industry. *Clon.Transgen*. 2014, 3:4.
4. Batista R.I., Luciano M.C., Teixeira D.I., Andreeva L.E, Serova I.A., Serov O.L., Freitas V.J., Melo L.M. Methodological Strategies for Transgene Copy Number Quantification in Goats (*Capra hircus*) Using Real-Time PCR. *Biotechnol.Prog*. 2014, 30(6):1390-400.
5. Исмаилов Ш.М., Барыкова Ю.А., Шмаров М.М., Тарантул В.З., Барсков И.В., Кучеряну В.Г., Брылев Л.В., Логунов Д.Ю., Тутыхина И.Л., Бочаров Е.В., Захарова М.Н., Народицкий Б.С., Иллариошкин С.Н. Экспериментальный подход к генной терапии болезни двигательного нейрона на основе использования генов гипоксия-индуцибельных факторов. *Генетика*. 2014, 50, 5, 591-601.
6. Лахин А.В., Тарантул В.З., Генинг Л.В. Индуцируемый марганцем некорректный синтез ДНК как возможная причина

манганизма. Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. 2014, 1, 15-30.

7. Новосадова Е.В., Гривенников И.А. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: от получения до применения в биохимических и биомедицинских исследованиях. Биохимия. 2014, 79 (13), 1425-1441.

8. Антонов С.А., Кобылянский А.Г., Андреева Л.А., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф. Модель тест-системы на основе эмбриональных стволовых клеток для скрининга перспективных лекарственных средств. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2014, 8, 15-21.

9. Лебедева О.С., Новосадова Е.В., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н., Гривенников И.А. Получение и характеристика клеточной модели болезни Паркинсона на основеиндуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Стволовые клетки и регенеративная медицина: Сборник статей. Под редакцией В.А. Ткачука; М.; Издательство Московского университета. 2014, 154-168.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ (ФРН) И НЕКОТОРЫХ ПЕПТИДОВ НА СПОСОБНОСТЬ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ (ЭС) КЛЕТОК МЫШИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАТЬСЯ В НЕЙРАЛЬНЫЕ И ДРУГИЕ ТИПЫ КЛЕТОК *IN VITRO*

А.Г. Кобылянский

Центр клеточных и генных технологий (ЦКГТ)

Для эффективной направленной дифференцировки ЭС клеток в специализированные типы соматических клеток необходимо изучение роли индивидуальных факторов роста на различных этапах этого процесса. Описаны многочисленные эффекты ФРН на рост и выживаемость клеток эмбриональной и взрослой нервной системы млекопитающих, а также известно, что рецепторы нейротрофинов р75 и TrkA экспрессируются на недифференцированных ЭС клетках и на их дифференцированных производных. Эти данные указывают на перспективы

применения ФРН как инструмента для регуляции нейральной дифференцировки ЭС клеток *in vitro* и разработки на его основе протоколов получения специализированных типов нейронов из ЭС клеток.

Нами был изучен профиль дифференцировки ЭС клеток, гиперэкспрессирующих ФРН, а также проведено изучение воздействия добавления рекомбинантного ФРН в среду на различные направления дифференцировки ЭС клеток.

В наших экспериментах было показано, что ЭС клетки, гиперэкспрессирующие ФРН, не отличаются по своему плюрипотентному фенотипу от клеток контрольной линии, гиперэкспрессирующих GFP, и ЭС исходной линии. В дифференцированных эмбрионидных телах (ЭТ), полученных от трансгенных линий клеток, не было выявлено достоверных различий в экспрессии нейральных, мезодермальных и энтодермальных маркеров.

В экспериментах с рекомбинантным ФРН было показано, что этот фактор не оказывает воздействия на образование нейральных предшественников в ЭТ на различных сроках культивирования *in vitro*. Как и гиперэкспрессия ФРН в ЭС клетках, рекомбинантный ФРН в концентрации 100 нг/мл не оказывал воздействия на экспрессию мезодермальных и энтодермальных маркеров в культурах дифференцирующихся ЭТ.

Анализ мРНК в дифференцирующихся ЭТ показал, что ФРН не изменял уровня экспрессии транскрипционных факторов, специфичных для нейроэпителиальных клеток, и радиальных глиальных клеток переднего и среднего мозга, что указывает на отсутствие влияния ФРН на региональную специфичность нейральных предшественников (НП) образующихся из ЭС клеток. В тоже время, ФРН значительно увеличивал образование дифференцированных нейронов в ЭТ. Примечательно, что нами не было выявлено достоверных различий в длине нейритов индивидуальных нейронов в контрольных и опытных культурах дифференцированных ЭС клеток. ФРН оказывал заметное влияние на фенотип дифференцированных нейронов, достоверно увеличивая образование холинэргических клеток и еще более выражено снижая образование ГАМКэргических клеток в получаемых культурах.

Таким образом, выявлены некоторые возможности и ограничения в применении ФРН для нейральной индукции в дифференцирующихся ЭС клетках мыши. Показано, что ФРН позволяет оказывать воздействие на терминальные этапы дифференцировки ЭС клеток в нейроны, заметно увеличивая выживаемость клеток, и может быть применен для получения популяций нейронов, обогащенных холинэргическими клетками.

В работах по созданию модели тест-системы, основанной на ЭС клетках мыши, для оценки токсического воздействия исследуемых соединений на процессы раннего эмбрионального развития исследовалось воздействие пептидов Селанка, Тиролиберина и HLDF-6 на дифференцировку ЭС клеток в различных направлениях: образование нейроэктодермальных клеток оценивалось по экспрессии мРНК маркерных генов *Rax6*, *Otx2*; мезодермальных - по экспрессии маркерного гена *Mix11* и энтодермальных - по экспрессии гена *SOX17*.

С помощью иммуноцитохимического окрашивания дифференцирующихся культур клеток определялась экспрессия белков, специфичных для нейральных предшественников (*SOX1*, *Nestin*) и нейронов (*b-III-тубулин*). С помощью ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), оценивался уровень мРНК генов-маркеров мезодермальных (*Mix11*), энтодермальных (*SOX17*) и нейроэктодермальных (*Otx2*, *Rax6*) производных. Оказалось, что изученные соединения не влияли на дифференцировку ЭС клеток ни в нейроэктодермальном, ни в мезодермальном, ни энтодермальном направлениях.

Публикации Центра клеточных и генных технологий:

1. Антонов С.А., Кобылянский А. Г., Андреева Л.А., Гривенников И.А., Мясоєдов Н.Ф. Модель тест-системы на основе эмбриональных стволовых клеток для скрининга перспективных лекарственных средств. Вестник биотехнологии. 2014, 10, 2, 5-11.
2. Брайловская И.В., Соколова Т.В., Кобылянский А.Г., Аврова Н.Ф. Влияние ганглиозида GM1 на митохондриальное дыхание и жизнеспособность клеток РС12 при действии на них окислительного стресса. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2014, 50, 2, 155-157.

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЙ КОМПОНЕНТОВ МИКРОБИОТ ЧЕЛОВЕКА

В.В. Демкин

Лаборатория молекулярной диагностики

Считается, что основным стабилизирующим фактором вагинальной экосистемы являются лактобактерии. Однако, видовая структура и количественная оценка лактобациллярного компонента существенно различаются в различных работах. Это может быть связано как с демографическими особенностями обследуемого контингента, так и с методическими различиями исследований, проводимых в разных научных группах.

Задачей на данном этапе являлась разработка методов количественной оценки основных бактериальных компонентов вагинальной микробиоты на основе метода ПЦР в реальном времени. Прежде всего был проведен сравнительный анализ геномов бактерий родов *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Gardnerella*, с целью выявления потенциальных генетических мишеней для их идентификации. Использовали собственную разработанную программу сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей полных геномов бактерий. Определены консервативные генетические локусы, способные служить генетическими маркерами изученных бактерий. Для идентификации вагинальных видов лактобактерий ацидофильного комплекса была определена новая генетическая мишень - ген *grlK*, кодирующий рибосомальный белок. Разработаны системы количественного определения основных бактериальных агентов вагинальной микробиоты человека на основе амплификации НК с детекцией в реальном времени. Разработаны системы для определения лактобациллярного компонента с групповым зондом и видовые зонды для определения всех основных видов лактобактерий.

Существенная часть работы была посвящена изучению влияния различных модификаций олигонуклеотидов на функциональные свойства праймеров и зондов. В частности, были исследованы свойства праймеров с негомологичными 5'-концами и зонды с различным соотношением и расположением locked nucleic acid аналогами.

Проведены пилотные исследования по оценке популяционного и видового разнообразия вагинальных микробиот. Количественные оценки содержания лактобактерий в образце нормировали как к геномной ДНК человека, попадающей в образец с эпителиальными клетками при взятии пробы, так и общему количеству бактериальной ДНК. Обнаружено, что различия в содержании лактобактерий колебались в диапазоне от единичных до 4×10^8 бактериальных клеток. Наиболее представленными были образцы с концентрацией лактобактерий 10^4 - 10^5 клеток – 18,5%, 10^5 - 10^6 клеток – 33%, 10^6 - 10^7 клеток – 26%. 18% образцов не содержали определяемых количеств лактобактерий, при этом они, за одним исключением, не содержали также и других агентов из числа исследованных. В исследованной выборке в лактоположительных пробах чаще всего определяли *L.inners* (59%), *L.crispatus* (39%), *L.jenseni* (25%), *L.jonsoni/L.gasseri* (13%), *L.helveticus* (10%). Ни разу не были выявлены *L.acidophilus*. 39% лактоположительных образцов содержали от 2 до 4-х видов лактобактерий.

Публикации Лаборатории молекулярной диагностики:

1. Демкин В.В. Гемотропные микоплазмы (гемоплазмы, гемобартонеллы) кошек и собак. Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. 2014, 4, 23-28.

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

Н.Ф. Мясоедов

Отдел химии физиологически активных веществ (ОХФАВ)

В 2014 году были продолжены исследования в области химии и биологии пептидов, как основы для создания новых лекарственных препаратов пептидной природы.

Сконструированы и синтезированы новые аминокислотные последовательности аналогов обестатина (4 пептида) и тиролиберина (7 пептидов), а также 8 пептидов общей формулы Pro-A-Pro, где А природная аминокислота. Все синтезированные

пептиды охарактеризованы хроматографическими и масс-спектрометрическими методами.

Ранее нами было показано, что N-концевой тетрапептид обестатина Phe-Asn-Ala-Pro сохраняет свойства обестатина влиять на вес животных. Все синтезированные аналоги обестатина модифицировались по C-концевой аминокислоте природными аминокислотами. Исследованы все синтезированные аналоги обестатина на физиологические параметры организма самцов белых крыс. Использовался интраназальный способ введения пептидов. Вводили фрагмент обестатина 1-4 (Phe-Asn-Ala-Pro), сохранивший свойства обестатина, и все синтезированные пептиды. Все исследуемые пептиды не влияли на потребление корма и воды, однако, крысы, которым вводили пептид Phe-Asn-Ala-Pro-Gly-Pro (10 крыс) медленнее прибавляли в весе. Остальные пептиды, судя по предварительным данным, эффекта на прирост массы тела не оказывали. Кроме того, расчёт индекса Кетле (отношение массы тела к квадрату длины тела животного от кончика носа до основания хвоста) показал, что под действием того же пептида, он нарастает достоверно медленнее, чем в контроле или в группах с введением других пептидов. Этот пептид будет исследоваться в дальнейшем в физиологических тестах *in vivo*.

Тиреотропин-рилизинг-гормон (протирелин, тиролиберин, TRГ) – пептидный гормон гипоталамуса является мощным стимулятором эмоционального поведения, двигательной активности, дыхательного центра и т.п. При проведении исследований физиологической активности синтезированных аналогов TRГ в качестве первичного метода скрининга было выбрано конкурентное лиганд-рецепторное взаимодействие. Этот метод дает возможность сразу оценить на молекулярном уровне гомологию физиологического действия исследуемого пептида по отношению к контролю. В качестве контроля использовали тиролиберин (протилерин), семакс и селанк, физиологическое действие которых хорошо известно. Установлено, что в диапазоне концентраций от 1 пМ до 10 мкМ все пептиды, в той или иной степени, оказывают влияние на связывание меченого лиганда на плазматических мембранах нервных клеток гиппокампа крысы, при этом характер указанного влияния и величины наблюдаемых эффектов сильно меняются в зависимости от структуры пептида. Показано, что пептиды H-Pyr-Gly-Pro-OH и H-Pyr-Thr-Pro-OH обладают

примерно такой же активностью как семакс и селанк. Эти пептиды в дальнейшем будут исследованы в физиологических тестах. Структура тиролиберина (протилерина), которую можно написать как 5-оксопролин-гистидил-пролинамид (H-Pyr-His-Pro-NH₂) очень напоминает исследуемый нами в последние годы трипептид пролин-глицил-пролин (Pro-Gly-Pro), обладающий различными физиологическими свойствами. Сравнение структуры этих двух трипептидов говорит о важности природы аминокислоты между двумя пролинами. Для проведения исследований аналогов трипептида Pro-Gly-Pro в 2014 году синтезировано и охарактеризовано 8 пептидов общей формулы Pro(X)-A-Pro(Y). Синтезирован меченный тритием трипептид Pro-Gly-Pro с молярной активностью 55 Ки/ммоль. Определены параметры специфического связывания этого пептида на плазматических мембранах клеток головного мозга крыс. Исследовано связывание Pro-Gly-Pro в присутствии изучаемых новых пептидов в широком диапазоне их концентрации. На крысах проведено исследование влияния четырех из синтезированных пептидов к гипобарической гипоксии, а также влияние на двигательную активность в тесте «открытое поле» и уровень тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Два из этих пептидов изучены в моделях, характерных для метаболического синдрома (влияние на уровень сахара, веса, холестерина, реологические показатели крови у крыс). Проведенные исследования *in vivo* показали наличие у новых пептидов ретинопротективных, нейропротективных, антикоагулянтных, антистрессорных и противоишемических свойств.

В 2014 году нами исследовались острые и отставленные эффекты неонатального введения антидепрессанта флувоксамина (ФА), относящегося к группе селективного ингибитора обратного захвата серотонина (СИОЗС), детенышам белых крыс с 1-го по 14-ый дни жизни. Было показано, что неонатальное введение ФА приводит к увеличению летальности, снижению массы тела и замедляет становление моторных рефлексов. В ответ на отмену препарата у крыс отмечается увеличение активности серотониновой системы. Впервые полученные данные позволяют заключить, что введение СИОЗС детенышам крыс в течение первых недель жизни является адекватной моделью для изучения эффектов пренатального воздействия препаратов этой группы у человека.

Изучение отставленных эффектов неонатального введения ФА показало, что у животных, получавших ФА, в возрасте 30-60 дней отмечается замедление соматического роста, увеличение тревожности, нарушение способности к обучению и возрастание активности серотонинергической системы. Хроническое интраназальное введение семакса после завершения курса ФА нормализует физическое развитие, эмоциональное состояние, способность к обучению и функциональное состояние системы биогенных аминов у животных, получавших неонатально антидепрессант. Эти исследования являются научной основой использования лекарственных препаратов на основе пептида семакс в педиатрии.

ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА)-ПОЛИМЕРАЗА-1 - ПЕРСПЕКТИВНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ КАРДИО- И НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ ТЕРАПИИ

С.И. Шрам

Сектор нейрофармакологии ОХФАВ

В отчетный период были продолжены исследования, направленные на выяснение патогенетических механизмов ряда нейро- и кардиопатологий, развитие новых экспериментальных подходов для изучения патологических процессов на клеточных моделях, а также на поиск и характеристику новых фармакологических веществ с нейро- и кардиопротекторным действием.

Поли(АДФ-рибозил)ирование белков играет важную роль во многих клеточных процессах, связанных как с поддержанием нормального функционирования клетки, так и с различными патологическими ситуациями. Ключевым белком в этом процессе является поли(АДФ-рибоза)-полимераза-1. Нами исследовалась вовлеченность системы поли(АДФ-рибозил)ирования белков в механизмы повреждения и гибели кардиомиоцитов при цитотоксическом действии доксорубина (Dox) и гипергликемии. Для моделирования этих процессов использовались первичные культуры кардиомиоцитов крысы и культуры покоящихся клеток H9c2 (кардиомиобласты крысы). Показано, что Dox и гипергликемический стресс способны значительно стимулировать поли(АДФ-рибозил)ирование

белков в клетках H9c2. Фармакологическое ингибирование этого процесса приводило к снижению степени повреждения (или фрагментации) ДНК и гибели клеток H9c2 на фоне цитотоксического действия Dox. При этом классические антиоксиданты не проявляли подобных эффектов. Полученные результаты указывают на возможную негативную роль системы поли(АДФ-рибозил)ирования белков в кардиомиопатиях, вызванных противоопухолевой терапией антрациклиновыми антибиотиками и сахарным диабетом. В докладе будут обсуждены возможные молекулярные механизмы, посредством которых поли(АДФ-рибозил)ирование белков вовлечено в повреждение и гибель кардиомиоцитов и нейронов при разных патологиях.

Публикации Отдела химии физиологически активных веществ (зарубежные):

1. Kolomin T. , Shadrina M., Morozova M. , Volkova A. , Andreeva L. , Slominsky P. , Limborska S. , Myasoedov N. The temporary dynamics of inflammation-related genes expression under tuftsin analog Selank action. *Molecular Immunology*. 2014, 58, 1, 50-55.
2. Medvedeva E.V., Dmitrieva V.G., Povarova O.V., Limborska S.A., Skvortsova V.I., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. The peptide semax affects the expression of genes related to the immune and vascular systems in rat brain focal ischemia: Genome-wide transcriptional analysis. *BMC Genomics*. 2014, 15(1): 228.
3. Sokolov O., Kost N., Andreeva O., Korneeva E., Meshavkin V., Tarakanova Y., Dadayan A., Zolotarev Y., Grachev S., Mikheeva I., Varlamov O., Zozuly A. Autistic children display elevated urine levels of bovine casomorphin-7 immunoreactivity. *Peptides*. 2014, 56, 68 – 71.
4. Маслов В.Ю., Веселовский М.С., Москалюк А.О., Мясоедов Н.Ф., Шрам С.И., Федулова С.А. Протекторное действие пептида пролин-глицин-пролина на электрофизиологические свойства культивируемых нейронов гиппокампа при эксайтотоксическом повреждении. *Физиологический журнал. (Украина)*. 2014, 60, 2, 3-11.

В российских журналах - 21 статья

В иностранных журналах - 4 статьи

Получено патентов российских - 3

ПОИСК НОВЫХ ПОДХОДОВ К ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

С.В. Костров

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

Разработка противораковых генно-терапевтических лекарственных средств интенсивно проводится во всем мире. Однако, несмотря на огромный потенциал, генная терапия сегодня имеет весьма ограниченное значение для медицины, что, в первую очередь, связано с недостаточной эффективностью имеющихся в настоящее время решений. Главной проблемой, по-видимому, является неэффективная доставка генетического материала, приводящая к тому, что трансген попадает не во все клетки опухоли и экспрессируется на недостаточном уровне. Прямой путь решения проблемы – создание новых более эффективных средств доставки – пока не позволил достичь существенных успехов. В то же время для поиска решения могут быть использованы подходы, связанные с повышением экспрессионной эффективности используемых генетических конструкций и организацией, так называемого, эффекта свидетеля – обеспечения действия генотерапевтического средства на нетрансфицированные клетки опухоли. Именно в рамках этих подходов в нашей лаборатории проводятся исследования, которые развиваются в трех основных направлениях. Первое сфокусировано на изучении возможности использования для генной терапии альтернативных плазмидам невирусных экспрессионных векторов, второе связано с созданием методов межклеточной передачи белков – продуктов экспрессии терапевтических генов, третье имеет своей задачей оптимизацию существующих систем суицидальной генетической терапии.

В 2014 году нами был создан набор экспрессионных векторов на основе линейных двухцепочечных молекул ДНК и начаты работы по количественной оценке обеспечиваемой ими эффективности экспрессии трансгенов. Осуществлена экспрессия в бактериальных клетках и клетках человека в культуре нескольких вирусных протеаз – потенциальных

генотерапевтических агентов, проведены работы по оценке их цитотоксической активности и начаты эксперименты, направленные на осуществление их межклеточной передачи. Начато изучение эффективности комбинированного действия цитотоксических агентов, в частности, совместного действия гена протеазы 3С вируса гепатита А человека (3Сpro) и высокоэффективного гибридного суицидного гена *FCU1*, который отвечает за синтез фермента, превращающего нетоксичный фторцитозин во фторурацил в раковых клетках. Для реализации синтеза двух белков с одного бицистронного транскрипта в клетках человека между *FCU1* и 3Сpro введен участок ДНК, соответствующий 2А пептиду свиного тешовируса-1. Продемонстрировано, что комбинация генов 3Сpro и *FCU1* в составе бицистронной конструкции обеспечивает их экспрессию, определяя эффективное цитотоксическое действие. Цитотоксическое действие 3Сpro и *FCU1* проявляется по-разному. Эффект 3Сpro развивается быстрее и, что особенно важно, не препятствует дальнейшему действию *FCU1*.

ХИМИЧЕСКАЯ КОММУНИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ НЕКОТОРЫХ МЕТАБОЛИТОВ (ЛЕТУЧИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, ЦИАНОТОКСИН ВМАО)

И.А. Хмель, О.А. Кокшарова

Лаборатория регуляции экспрессии генов микроорганизмов
ОМГОБиБИ

Тематика исследований Лаборатории включает следующие направления: 1) Quorum Sensing (QS) - глобальная регуляция экспрессии генов бактерий, роль QS в контроле клеточных процессов; 2) летучие органические соединения, выделяемые бактериями, механизмы их действия на различные биологические объекты, роль в коммуникации бактерий; 3) цианотоксин ВМАО и его функции в клетках цианобактерий. Кроме того, проводятся работы по изучению взаимодействия наночастиц металлов с бактериями и биогенезу наночастиц.

Показано, что бактерии синтезируют различные летучие соединения, в том числе, органические (ЛОС), их принято называть «infochemicals», т.е. химические носители информации. Выделяемые одними бактериями, они могут действовать на больших расстояниях, подавляя рост микроорганизмов. Изучение ЛОС открывает новые аспекты антагонистических отношений между микроорганизмами и их взаимодействия с высшими организмами. Мы показали, что ЛОС ризосферных и почвенных бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* ингибируют рост бактерий и фитопатогенных грибов, а также оказывают убивающее действие на нематоды и дрозифилу. Общий пул летучих веществ, выделяемых бактериями, и индивидуальные ЛОС подавляли образование биопленок и убивали бактерии внутри биопленок у нескольких штаммов *Agrobacterium tumefaciens* различного происхождения, образующих опухоли на различных растениях. Проводится работа по изучению действия ЛОС на растения (на модели *Arabidopsis thaliana*). Показано, что летучие вещества, синтезируемые штаммами *Pseudomonas* и *Serratia* (суммарный пул), и отдельные ЛОС (кетоны 2-нонанон, 2-гептанон, 2-ундеканон; диметилдисульфид) ингибировали рост растений и вызывали хлорозис. Наиболее сильное действие на растения оказывал 2-нонанон, вызывая гибель растений. Планируется проведение протеомных исследований действия ЛОС на растительной модели. С целью изучения механизмов действия ЛОС исследуются транспозонные мутанты цианобактерий, устойчивые к действию ЛОС, определяется локализация инсерций транспозонов, проводится работа по получению нокаута генов, определяется, вызывают ли ЛОС оксидантное / антиоксидантное действие.

Среди молекул с сигнальным действием большое внимание привлекают цианотоксины, молекулы различной природы, образуемые фотоавтотрофными прокариотами - цианобактериями. Нейротоксичная аминокислота ВМАО (бета-N-метиламин-L-аланина), синтезируемая цианобактериями, связывается с глутаматными рецепторами в мозге человека и животных, приводя к тяжелым нейродегенеративным заболеваниям. Подобные рецепторы обнаружены у растений и цианобактерий. Функциональная роль ВМАО в клетках цианобактерий остается практически не изученной. Можно было предположить, что в цианобактериальной клетке ВМАО и

глутаматный рецептор функционально связаны. С целью изучения роли ВМАО в метаболизме цианобактерий мы использовали модельный штамм нитчатой азотфиксирующей цианобактерии *Anabaena* sp. PCC 7120 и ее мутант, лишенный глутаматного рецептора (GluRO). Было показано, что в условиях азотфиксации ВМАО полностью ингибирует активность нитрогеназы в клетках дикого типа и приводит к репрессии дифференцировки гетероцист, специализированных клеток, в которых происходит фиксация атмосферного азота, а также к нарушениям деления вегетативных клеток. Мутант GluRO не формирует гетероцисты и лишен нитрогеназной активности. Таким образом, мы впервые показали, что глутаматный рецептор цианобактерии *Anabaena* необходим для клеточной дифференцировки и нитрогеназной активности в условиях азотфиксации и что добавление ВМАО препятствует формированию гетероцист в клетках штамма дикого типа. Планируются новые эксперименты с привлечением методов ТЕМ, протеомики и биохимии для дальнейшего изучения этого феномена. С целью идентификации генов цианобактерий, контролирующих устойчивость к ВМАО, проведен транспозонный мутагенез клеток *Anabaena* sp. PCC 7120 и отобраны 12 мутантов, устойчивых к ВМАО. Начата работа по идентификации и характеристике этих мутаций.

Публикации Отдела молекулярно-генетических основ биотехнологии и белковой инженерии:

1. Mikhailova A.G., Khairullin R.F., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Y., Rumsh L.D. Cloning, sequencing, expression, and characterization of thermostability of oligopeptidase B from *Serratia proteamaculans*, a novel psychrophilic protease. *Protein Expr Purif.* 2014, 93: 63-76.
2. Koeck D.E., Pechtl A., Zverlov V.V., Schwarz W.H. Genomics of cellulolytic bacteria. *Curr Opin Biotechnol.* 2014. 29: 171-183.
3. Koeck D.E., Wibberg D., Maus I., Winkler A., Albersmeier A., Zverlov V.V., Liebl W., Puhler A., Schwarz W.H., Schluter A. Complete genome sequence of the cellulolytic thermophile *Ruminoclostridium cellulosi* wild-type strain DG5 isolated from a thermophilic biogas plant. *J Biotechnol.* 2014, 188C:, 136-137.

4. Koeck D.E., Wibberg D., Maus I., Winkler A., Albersmeier A., Zverlov V.V., Puhler A., Schwarz W.H., Liebl W., Schluter A. First draft genome sequence of the amyolytic *Bacillus thermoamylovorans* wild-type strain 1A1 isolated from a thermophilic biogas plant. *J Biotechnol.* 2014.192 Pt A: 154-155.
5. Koeck D.E., Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H. Comparative genotyping of *Clostridium thermocellum* strains isolated from biogas plants: genetic markers and characterization of cellulolytic potential. *Syst Appl Microbiol.* 2014, 37(5): 311-319.
6. Panitz J.C., Zverlov V.V., Pham V.T., Sturzl S., Schieder D., Schwarz W.H. Isolation of a solventogenic *Clostridium* sp. strain: fermentation of glycerol to n-butanol, analysis of the bcs operon region and its potential regulatory elements. *Syst Appl Microbiol.* 2014, 37(1):1-9.
7. Popova A.A., Koksharova O.A., Lipasova V.A., Zaitseva Ju. V., Katkova-Zhukotskaya O.A., Eremina S.Iu., Mironov A.S., Chernin L.S., Khmel A. I. Inhibitory and toxic Effects of Volatiles emitted by Strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on Growth and Survival of selected Microorganisms, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *BioMed Research International.* 2014:125704, 11 p.
8. Плюта В.А., Попова А.А., Кокшарова О.А., Кузнецов А.Е., Хмель И.А. Способность природных кетонов взаимодействовать с бактериальными Quorum Sensing системами. *Мол. генетика микробиол., вирусол.* 2014, 4, 10-13.
9. Зайцева Ю.В., Попова А.А., Хмель И.А. Регуляция типа Quorum Sensing у бактерий семейства Enterobacteriaceae. *Генетика.* 2014, 50, 4, 373-391.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ CRISPR-CAS АДАПТАЦИИ У *E. COLI*

К.В. Северинов

Лаборатория регуляции экспрессии генов мобильных
элементов прокариот

CRISPR-Cas системы обеспечивают защиту клеток прокариот от мобильных генетических элементов. CRISPR-Cas системы действуют за счет малых РНК, комплементарно узнающих

мишени в чужеродных ДНК или РНК. Спейсеры, т.е., участки ДНК, кодирующие защитные малые CRISPR РНК, приобретаются в ходе псевдо-ламарковского процесса, называемого «CRISPR адаптация». В рамках исследования молекулярных механизмов CRISPR-Cas адаптации в 2014 получены следующие результаты.

С помощью разработанной методики выделения белкового комплекса Cascade *Echerichia coli* (в составе с CRISPR РНК и без нее) продемонстрировано, что комплексы с мишенями, несущими “эскейп” мутации, нарушающие, но стимулирующие уничтожение мишени, но стимулирующими адаптацию, качественно не отличаются от комплексов с мишенями с полным соответствием спейсеру CRISPR РНК. Также показано, что последовательность CRISPR РНК, фланкирующая 3'-конец спейсерного участка, не требуется для узнавания мишени.

В опытах по хроматин-иммунопреципитации с детекцией методами qPCR и ChIP-seq показано, что в условиях активной адаптации комплекс Cas1/2 преимущественно связывается с лидерным участком CRISPR-кассеты *E. coli*, а также с фрагментами чужеродной ДНК длиной около 50 нуклеотидов и содержащих протоспейсеры, используемые в адаптации. Полученные результаты является первым прямым указанием на существование свободных интермедиатов реакции адаптации, “вырезанных” из ДНК-мишени.

Создана экспериментальная система адаптации CRISPR-Cas системы подтипа I-F *Pseudomonas aeruginosa* при гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli*. Показано, что CRISPR-Cas система *P. aeruginosa* способна к праймированной адаптации, а также к непраймированной адаптации, для которой необходимы не только белки Cas1 и Cas2, но и комплекс Csy (аналог Cascade) и CRISPR РНК.

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

1. Tagami, S., Sekine, S., Minakhin, L., Esyunina, D., Akasaka, R., Shirouzu, M., Kulbachinskiy, A., Severinov, K., Yokoyama, S. Structural basis for RNA polymerase promoter specificity switching by a phage factor. *Genes Dev.* 2014, 28, 521-531.
2. Shkundina I., Serebryakova M., Severinov K. The C-terminal unmodified part of microcin B is required for DNA gyrase inhibition

and antibiotic entry into sensitive cells. *J. Bacteriol.* 2014, 196, 1759-1767.

3. Shmakov S., Savitskaya E., Semenova E., Datsenko K. A., Severinov, K. Pervasive generation of oppositely-oriented spacers during CRSPR adaptation. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42, 5907-5916.

4. Kulikovskiy A., Serebryakova M., Bantysh O., Metlitskaya A., Borukhov S., Severinov K., Dubiley S. The molecular mechanism of aminopropylation of peptide-nucleotide antibiotic microcin C. *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 11168-11175.

5. Ceysens P.-J., Minakhin L., Van den Bossche A., Yakunina M., Klimuk E., Blasdel B., De Smet J., Noben J.-P., Bläsi U., Severinov K. Lavigne R. Development of giant bacteriophage ϕ KZ is independent of host transcription apparatus. *J. Virol.* 2014, 88, 10501-10510.

6. Kazakov T., Kuznedelov K., Semenova E., Mukhamedyarov D., Datsenko K.A., Vondenhoff G. H., Tikhonov A., Agarwal V., Nair S., Van Aerschot V., Severinov K. The RimL transacetylase provides resistance to translation inhibitors microcin C and albomycin. *J. Bacteriol.* 2014, 196, 3377-3385.

7. Zukher I., Novikova M., Tikhonov A., Nesterchuk M., Osterman I., Djordjevic M., Sergiev P., Sharma C., Severinov K. Ribosome-controlled transcription termination is essential for production of antibiotic microcin C. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42, 11891-11902.

8. Mekler V., Minakhin L., Borukhov S., Mustaev A., Severinov K. Downstream RNA polymerase-promoter interactions control the key step in the pathway of transcription initiation. *J. Mol. Biol.* 2014, 426, 3973-3984.

9. Severinov K., Minakhin L., Sekine S.-I., Lopatina A., Yokoyama S. Molecular basis of RNA polymerase promoter specificity switch revealed through studies of *Thermus* bacteriophage transcription regulator. *Bacteriophage*, 2014, 4, e29399.

10. Agarwal V., Vondenhoff G., Gadakh B., Severinov K. Van Aerschot A., Nair S.K. Exploring the substrate promiscuity of an antibiotic inactivating enzyme. *MEDCHEMCOMM* OCT. 2014, e: 5, Issue: 10, 1567-1570.