

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

**Перспективные направления
молекулярной генетики**

XXVI ЕЖЕГОДНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

5-6 февраля 2018 г.

ПРОГРАММА

5 февраля, понедельник

Утреннее заседание, начало в 10:30

Открытие конференции

Вступительное слово члена-корреспондента РАН
С.В. КОСТРОВА (15 мин)

Председатель – П.А. Сломинский

М.С. КЛЕНОВ - ст.н.с. Лаборатории биохимической генетики животных ОМГК. «Регуляция экспрессии копий рибосомной ДНК, содержащих инсерции ретротранспозонов». (20 мин)

Л.В. ОЛЕНИНА - ст.н.с. Лаборатории биохимической генетики животных ОМГК. «Двойная роль РНК-хеликазы Belle (DDX3) в поддержании и дифференцировке мужских герминальных клеток *Drosophila melanogaster*». (20 мин)

Н.В. АКУЛЕНКО - ст.н.с. Лаборатории исследования геномных повторов эукариот (ЛИГПЭ). Трансгены, содержащие фрагменты транспозонов, как модель для изучения рiРНК-кластеров в герминальных клетках *Drosophila*. (20 мин)

П е р е р ы в (15 мин)

Председатель – А.И. Калмыкова

А.В. СИМОНЕНКО – м.н.с. Лаборатории геномной изменчивости ОМГК. «Структурно-функциональная изменчивость нейронального гена shuttle craft определяет продолжительность жизни дрозофилы». (20 мин)

Д.В. ПУПОВ - ст.н.с. Лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ОМГК. «Неканонические функции сигма-

факторов бактериальной РНК-полимеразы в регуляции транскрипции» (20 мин)

А.В. КУЗЬМЕНКО – н.с. Лаборатории биологии РНК и эпигенетики (ЛБРИЭ). «Структура и функции бактериальных белков-аргонавтов». (20 мин)

П е р е р ы в (1,5 часа)

Вечернее заседание, начало в 15:30

Председатель – С.А. Лимборская

С.И. ШРАМ – зав. Сектором нейрофармакологии ОХФАВ. «Роль системы поли(АДФ-рибозил)ирования белков в стресс-индуцированных реакциях клетки на патологические воздействия». (20 мин)

Т.В. ВЬЮНОВА – н.с. Сектора регуляторных пептидов ОХФАВ. «Молекулярные аспекты нейрорегуляторной активности фармакологически важных пептидов». (20 мин)

Е.А. СЕБЕНЦОВА – н.с. Лаборатории молекулярных основ регуляции поведения ОХФАВ. «Экспериментальные модели патологий раннего развития: оценка возможности пептидергической коррекции». (20 мин)

В.А. ПЛЮТА - н.с. Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов (ЛРЭГМ). «Функциональная роль и механизмы действия летучих органических соединений, синтезируемых микроорганизмами». (20 мин)

Е.Е. САВИЦКАЯ – ст.н.с. Лаборатории регуляции экспрессии генов мобильных элементов прокариот (ЛРЭГМЭП). «Специфичность выбора спейсеров при CRISPR-адаптации в CRISPR-Cas системе типа I-E у *Escherichia coli*». (20 мин)

6 февраля, вторник

Утреннее заседание, начало в 10:30

Председатель – Е.Г. Пасюкова

М.И. ШАДРИНА – вед.н.с. Лаборатории молекулярной генетики наследственных болезней ОМОГЧ. «Поиск молекулярных мишеней и механизмов, связанных с развитием депрессии: между моделью и пациентом». (20 мин)

А.В. ХРУНИН – ст.н.с. Лаборатории молекулярной генетики человека ОМОГЧ. «Эволюционная история популяций субарктического трансуральского региона». (20 мин)

В.Г. ДМИТРИЕВА – н.с. Лаборатории функциональной геномики ОМОГЧ. «Исследование изменений работы генов при развитии заболеваний и под действием пептидных препаратов». (20 мин)

В.А. ШЕПЕЛЕВ – н.с. Лаборатории биоинформатики. «Измерения альфа-сателлита. Глобальный взгляд на альфа-сателлитные повторы центромер». (20 мин)

П е р е р ы в (15 мин)

Председатель – М.А. Петрова

В.В. НЕНАШЕВА – ст.н.с. Лаборатории репликации и репарации генома ОВКМГ. «Роль белка TRIM14 в формировании противовирусных реакций врожденного иммунитета». (20 мин)

Е.В. НОВОСАДОВА – ст.н.с. Лаборатории молекулярной генетики соматических клеток ОВКМГ. «Нейрональные производные ИПСК in vivo и in vitro ,особенности и перспективы использования». (20 мин)

О.В. Долотов - ст.н.с. Лаборатории молекулярной генетики соматических клеток ОВКМГ. «Изучение роли меланокортиновой системы в стрессовом ответе и развитии депрессивных состояний». (20 мин)

П е р е р ы в (1,15 ч)

Вечернее заседание, начало в 15:30

Председатель – И.А. Хмель

И.В. ДЕМИДЮК – зав. Лабораторией функциональной энзимологии ОМГОБиБИ. «Зачем бактериям протеализинподобные протеазы?». (20 мин)

Д.Р. САФИНА – н.с. Лаборатории белковой инженерии ОМГОБиБИ. «Трансплантационные модели организменного уровня на основе *danio rerio*». (20 мин)

И.В. АЛЕКСЕЕНКО – зав. Сектором генной онкотерапии ОМГОБиБИ. «Противоопухолевая эффективность комбинации суицидальной и иммунной генной терапии». (20 мин)

А.В. МАКАРОВА – рук. Группы «Специализированные ДНК-полимеразы» (ГСДП). «Роль специализированных ДНК-полимераз человека в защите клеток от повреждений ДНК и мутагенезе». (20 мин)

**Заключительное слово члена-корреспондента РАН
С.В. КОСТРОВА (30 мин)**

Заккрытие конференции

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

Регуляция экспрессии копий рибосомной ДНК, содержащих инсерции ретротранспозонов

М.С. Клёнов

*Лаборатория биохимической генетики животных
Отдела молекулярной генетики клетки (ОМГК)*

Кластеры рибосомной ДНК (рДНК) в клетках эукариот обычно состоят из сотен повторяющихся единиц рДНК, из которых только часть транскрипционно активны. Неизвестно, чем именно определяется выбор активных и репрессированных копий рДНК. У *Drosophila melanogaster* от 15 до 40% копий рДНК содержат инсерции ретротранспозонов R2, которые встраиваются исключительно в строго определенный сайт в последовательности 28S рРНК. Эти транспозоны не имеют собственного промотора и при транскрипции их последовательность входит в состав предшественника пре-рРНК и затем может вырезаться при процессинге. Как правило, гены рДНК с инсерциями R2 демонстрируют очень низкий уровень экспрессии по сравнению с активными копиями неинсертированных генов рДНК, однако механизм репрессии R2 остается невыясненным. На роль фактора, определяющего репрессию копий рДНК со вставками транспозонов могут претендовать короткие некодирующие РНК, которые, как известно, участвуют в подавлении экспрессии различных транспозонов. Действительно, мы обнаружили антисмысловую транскрипцию транспозонов R2, которая является источником антисмысловых коротких РНК. Однако, мутации, нарушающие системы сайленсинга с помощью siРНК и piРНК, приводят лишь к слабому возрастанию экспрессии R2, что указывает на существование другого пути репрессии инсертированных рДНК. В то же время, короткие РНК играют определенную вспомогательную роль в подавлении R2. Оказалось, что

отсутствие рiРНК-связывающего белка Рiwi приводит к существенной овер-экспрессии сильно укороченных фрагментов R2, которые присутствуют в геноме некоторых линий дрозофилы. Гены рДНК с короткими фрагментами R2 производят больше транскриптов, чем другие инсертированные копии. Следовательно, сильно укороченные инсерции R2, регулируемые при помощи Рiwi, по-видимому, избегают воздействия со стороны «основного» механизма репрессии. Мы также исследовали возможную роль белков гетерохроматина в репрессии копий рДНК со вставками транспозонов. Несмотря на то, что хроматин копий рДНК с инсерциями R2 обогащен модификацией H3K9me3, характерной для гетерохроматина, а также белком HP1a, отсутствие компонентов гетерохроматина вызывало незначительное усиление экспрессии R2. Эти результаты позволяют постулировать существование особой системы репрессии копий рДНК, прямо не связанной с функционированием коротких РНК и гетерохроматинизацией. Наконец, нам удалось выявить один из компонентов этой системы. Мутации в гене *udd*, кодирующем белок Underdeveloped (Udd), взаимодействующий с комплексом инициации транскрипции РНК-полимеразы 1, вызывают увеличение на несколько порядков транскрипцию копий рДНК со вставками R2.



Двойная роль РНК-хеликазы Belle (DDX3) в поддержании и дифференцировке мужских герминальных клеток *Drosophila melanogaster*

Л.В. Оленина

*Лаборатория биохимической генетики животных
Отдела молекулярной генетики клетки (ОМГК)*

Наше исследование посвящено изучению функций DEAD-бокс-содержащей РНК-хеликазы Belle (DDX3) в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*. Ранее мы показали, что

нарушение экспрессии гомологичного белка человека DBY (DDX3Y) приводит к потере герминальных клеток семенников и бесплодию, при сохранении соматических клеток ниши, что известно как Сертоли-клеточный синдром. Но́кдаун Belle в герминальных клетках или мутация ведут к тотальной потере герминальных клеток, в том числе стволовых, в семенниках дрозофилы, при поддержании соматических клеток цисты. В семенниках мутантов *belle* происходит G2-арест клеточного цикла ранних герминальных клеток, а также снижение экспрессии митотических циклинов A и B. Эктопическая экспрессия дополнительной копии циклина B на фоне RNKi-но́кдауна Belle в герминальных клетках обеспечивает частичное спасение герминальных клеток и восстановление фертильности самцов.

Мы обнаружили, что, с другой стороны, RNAi-но́кдаун Belle в соматических клетках семенников приводит к формированию больших кластеров ранних герминальных клеток, которые не вступают в дальнейшую дифференцировку. Герминальные клетки в кластерах экспрессируют маркеры стволовых клеток и бесконтрольно и асинхронно пролиферируют. Гиперплазия ранних герминальных клеток сопровождается нарушением адгезионных контактов между герминальными клетками и соматическими клетками цисты. Мы нашли, что нарушение формирования цист приводит к гиперактивации сигнального пути BMP в герминальных клетках кластеров. Эктопическая экспрессия трансгенной копии белка клеточной адгезии бета-интегрин на фоне RNKi-но́кдауна Belle в соматических клетках цисты приводит к восстановлению ранних стадий сперматогенеза в 80% случаев и к подавлению туморообразной гиперплазии ранних герминальных клеток. Таким образом, наши данные свидетельствуют о двойственной роли РНК-хеликазы Belle в процессе сперматогенеза и о существенных клеточно-автономных и неавтономных ее функциях в герминальных и соматических клетках семенников.

Для поиска непосредственных мишеней трансляционной регуляции РНК-хеликазы Belle в семенниках мы провели CLIP-

seq эксперименты. С помощью глубокого секвенирования двух полученных CLIP-библиотек мы получили наборы данных в 11 и 13 млн. прочтений. Анализ полученных библиотек и картирование их на геномную сборку dm6 геномного браузера UCSC позволил определить 3' и 5' нетранслируемые области мРНК, взаимодействующие с Belle в семенниках более чем для 60 белок-кодирующих генов. Последующий GO анализ полученных данных позволил нам построить сети взаимодействий и обнаружить обогащение белок-белковыми комплексами в таких GO категориях, как убиквитинилирование и протеолиз белков, ядерный транспорт белков и РНК в цитоплазму, деаденилирование мРНК, эндоцитоз и др. В ближайших наших планах – подтверждение специфичности ряда найденных взаимодействий независимыми методами.

Публикации Отдела молекулярной генетики клетки (ЛБГЖ):

1. Kotov AA, Olenkina OM, Godneeva BK, Adashev VE, Olenina LV. Progress in understanding the molecular functions of DDX3Y (DBY) in male germ cell development and maintenance. *Biosci Trends*. 2017 Mar 22;11(1):46-53.
2. Shatskikh AS, Abramov YA, Lavrov SA. Trans-inactivation: Repression in a wrong place. *Fly (Austin)*. 2017 Apr 3;11(2):96-103.
3. Ilyin AA, Ryazansky SS, Doronin SA, Olenkina OM, Mikhaleva EA, Yakushev EY, Abramov YA, Belyakin SN, Ivankin AV, Pindyurin AV, Gvozdev VA, Klenov MS, Shevelyov YY. Piwi interacts with chromatin at nuclear pores and romiscuously binds nuclear transcripts in Drosophila ovarian somatic cells. *Nucleic Acids Res*. 2017. May 2. V. 45. N13. P. 7666-7680.
4. Ryazansky S, Radion E, Mironova A, Akulenko N, Abramov Y, Morgunova V, Kordyukova MY, Olovnikov I, Kalmykova A. Natural variation of piRNA expression affects immunity to transposable elements. *PLoS Genet*. 2017 Apr 27;13(4):e1006731.
5. Radion E, Ryazansky S, Akulenko N, Rozovsky Y, Kwon D, Morgunova V, Olovnikov I, Kalmykova A. Telomeric Retrotransposon HeT-A Contains a Bidirectional Promoter that Initiates Divergent Transcription of piRNA Precursors in Drosophila Germline. *J Mol Biol*. 2017 Oct 27;429(21):3280-3289.

6. Savvateeva-Popova EV, Zhuravlev AV, Brázda V, Zakharov GA, Kaminskaya AN, Medvedeva AV, Nikitina EA, Tokmatcheva EV, Dolgaya JF, Kulikova DA, Zatsepina OG, Funikov SY, Ryazansky SS, Evgen'ev MB. *Drosophila* Model for the Analysis of Genesis of LIM-kinase 1-Dependent Williams-Beuren Syndrome Cognitive Phenotypes: INDELS, Transposable Elements of the Tc1/Mariner Superfamily and MicroRNAs. *Front Genet.* 2017 Sep 20;8:123.
7. Рязанский С., Столяренко А.Д., Кленов М.С., Гвоздев В.А. Индукция системы подавления экспрессии транспозонов в клетках зародышевого пути дрозофилы. *Биохимия.* 2017. Т. 82. № 5. С. 760-767.
8. Коган Г.Л., Акуленко Н.В., Абрамов Ю.А., Соколова О.А., Фефелова Е.А., Гвоздев В.А. NAC (NASCENT POLYPEPTIDE ASSOCIATED COMPLEX) как тканеспецифичный кофактор при дифференцировке терминальных клеток в семенниках дрозофилы. *Молекулярная биология.* 2017. Т. 51. № 4. С. 677-682.
9. Фефелова Е.А., Столяренко А.Д., Якушев Е.Ю., Гвоздев В.А., Кленов М.С. система piRNA участвует в привлечении компонента комплекса инициации транскрипции РНК-полимеразы I в ядрышки герминальных клеток. *Молекулярная биология.* 2017. Т. 51. № 5. С. 824-830.



Трансгены, содержащие фрагменты транспозонов, как модель для изучения piRNA-кластеров в герминальных клетках *Drosophila*

***Н.В. Акуленко, С.С. Рязанский, В.В. Моргунова,
П.А. Комаров, А.И. Калмыкова***

*Лаборатория исследования геномных повторов эукариот
(ЛИГПЭ)*

Экспрессия мобильных элементов в зародышевой линии контролируется особым классом коротких РНК, Piwi-interacting РНК (piRNA), продуцируемыми геномными локусами, называемыми piRNA-кластерами и связанными с белком Rhino, гомологом Heterochromatin Protein 1 (HP1). Ранее мы показали, что трансгены, содержащие фрагмент ретротранспозона I, образуют de novo piRNA-кластеры в зародышевой линии

дрозофилы, что обеспечивает подавление активности I-элемента. Мы заметили, что идентичные трансгены, расположенные в разных геномных сайтах, значительно различаются в производстве piРНК и разделили их на «сильные» и «слабые» piРНК-кластеры. На данном этапе работы мы исследовали, какие изменения хроматина и транскрипции происходят в участках локализации трансгена после их превращения в кластеры piРНК. Мы обнаружили, что образование трансгенного piРНК кластера сопровождается активацией транскрипции обеих геномных цепей, которая, вероятно, инициируется в нескольких случайных сайтах. Хроматин всех трансгенных piРНК-кластеров содержит высокий уровень триметилированного лизина 9 гистона H3 (H3K9me3) и HP1a, тогда как связывание Rhino значительно выше в сильных кластерах. Ни один из этих белков хроматина не был обнаружен в «пустых» сайтах до введения трансгена. Наконец, мы показали, что в ядре полиплоидных питающих клеток образование трансгенного piРНК-кластера на конкретной геномной копии работает по принципу «все или ничего»: либо существует высокое обогащение Rhino и высокая продукция piРНК, либо ассоциация геномной копии с белком Rhino отсутствует. В результате геномные копии слабого трансгенного кластера показывают мозаичную картину колокализации с фокусами Rhino в полиплоидных ядрах, в то время как все копии сильного кластера ассоциируются с Rhino и, следовательно, участвуют в производстве piРНК.

**Публикации Лаборатории исследования геномных повторов
эукариот:**

1. Ryazansky S, Radion E, Mironova A, Akulenko N, Abramov Y, Morgunova V, Kordyukova MY, Olovnikov I, Kalmykova A. Natural variation of piRNA expression affects immunity to transposable elements. PLoS Genet. 2017 Apr 27;13(4):e1006731.
2. Radion E, Ryazansky S, Akulenko N, Rozovsky Y, Kwon D, Morgunova V, Olovnikov I, Kalmykova A. Telomeric Retrotransposon HeT-A Contains a Bidirectional Promoter that Initiates Divergent Transcription of piRNA



Структурно-функциональная изменчивость нейронального гена *shuttle craft* определяет продолжительность жизни дрозофилы

А.В. Симоненко

Лаборатория геномной изменчивости Отдела молекулярной генетики клетки (ОМГК)

Ген *shuttle craft* (*stc*) кодирует репрессор РНК-полимеразы II, который в эмбрионе дрозофилы экспрессируется в клетках ЦНС и необходим для ее нормального развития. Ранее мы показали, что *stc* участвует в контроле продолжительности жизни (ПЖ) дрозофилы, причем инсерционная мутация в 5'-нетранслируемой области (НТО) гена приводит к уменьшению экспрессии гена у эмбрионов и увеличению ПЖ.

Природный полиморфизм *stc* влияет на экспрессию гена и ПЖ.

Для выявления возможной адаптивной изменчивости был проведен анализ полиморфизма 5' регуляторной области и 5'-НТО гена *stc* в 200 изогенных линиях, полученных из мух, обитавших в различных климатических и экологических условиях: в Александрове (Россия, 2010-2012 гг.), Умани, Варве и Чернобыле (Украина, 2012). Были также использованы опубликованные последовательности пяти популяций из разных частей мира. Исследуемый район гена продемонстрировал заметную изменчивость, в том числе между близко расположенными популяциями. Среди восьми однонуклеотдных полиморфизмов (ОНП), которые встречались не менее чем в 5% линий из популяции Александров, один был достоверно связан с изменчивостью ПЖ и транскрипции гена *stc*. При этом, как в случае исследованной нами ранее инсерционной мутации,

увеличение ПЖ было связано с уменьшением транскрипции *stc*. Значимый ОНП входит в возможные мотивы узнавания регуляторных белков. Таким образом, наблюдаемая в природе изменчивость 5' регуляторной области и 5'-НТО гена *stc* должен иметь функциональное значение.

Нокдаун *stc* в нервной системе увеличивает ПЖ и активирует нейрональные гены

РНК-и нокдаун *stc* во всех клетках нервной системы, а также в ЦНС эмбриона увеличивает ПЖ. В последнем случае изменяется транскрипция нескольких групп генов, участвующих в развитии нервной системы. В частности, активируются гены, определяющие рост аксонов и структуру микротрубочек (*Unc115a*, *Unc115b* и др.), структуру базальной мембраны (*Vkg*), а также гены сериновых протеаз, участвующих в контроле нейрогенеза и скорости развития систем эмбриона (*Jon25Bii*, *Jon99Cii* и др.). Этим могут объясняться наблюдаемые нами на более поздних стадиях развития изменения структуры и активности нейромышечных связей.

Заключение

Умеренное (в 1,5-2 раза) снижение транскрипции *stc* на эмбриональной стадии развития, вызванное структурными изменениями в регуляторной области гена или его нокдауном, связано с увеличением ПЖ дрозофилы. Уменьшение транскрипции *stc* в ЦНС эмбрионов приводит к активации генов, участвующих в нейрогенезе, что, вероятно, оказывает долговременное влияние на функции организма, в том числе на ПЖ имаго.

Публикации Лаборатории геномной изменчивости ОМГК:

1. Moskalev A, Anisimov V, ... Pasyukova E, et al. Aging-US (Albany NY). 2017 Jan 29;9(1):7-25. (Albany, NY, USA).
2. Rybina OY, Sarantseva SV, Veselkina ER, Bolschakova OI, Symonenko AV, Kremntsova AV, Ryabova EV, Roshina NV, Pasyukova EG. Tissue-

specific transcription of the neuronal gene Lim3 affects *Drosophila melanogaster* lifespan and locomotion. *Biogerontology*. 2017 May, V. 18, N 5. P. 739-757.

3. Tsybul'ko E, Kremntsova A, Symonenko A, Rybina O, Roshina N, Pasyukova E. The Mitochondria-Targeted Plastoquinone-Derivative SkQ1 Promotes Health and Increases *Drosophila melanogaster* Longevity in Various Environments. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017 Apr 1;72(4):499-508.

4. Pasyukova EG, Vaiserman AM. HDAC inhibitors: A new promising drug class in anti-aging research. *Mech Ageing Dev*. 2017 Sep;166:6-15.

5. Pasyukova E.G., Feniouk B.A., Skulachev V.P. Mitochondria-targeted rechargeable antioxidants as potential anti-aging drugs. RSC Drug Discovery Series. In: *Anti-Aging Drugs. From Basic Research to Clinical Practice*, Vaiserman A. M. (ed.), The Royal Society of Chemistry, 2017, V. 57, P. 205-227. ISBN: 978-1-78262-435-6. ISSN: 2041-3203.

6. Pasyukova E. G., Vaiserman A. M. HDAC Inhibitors: A New Avenue in Anti-Aging Medicine. In: *Anti-Aging Drugs. From Basic Research to Clinical Practice*, Vaiserman A. M. (ed.), The Royal Society of Chemistry, 2017, V. 57, P. 514-534. ISBN: 978-1-78262-435-6. ISSN: 2041-3203.



Неканонические функции сигма-факторов бактериальной РНК-полимеразы в регуляции транскрипции

Д.В. Пупов

*Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов
Отдела молекулярной генетики клетки (ОМГК)*

Сигма-субъединица бактериальной РНК-полимеразы (РНКП) играет главную роль в процессе узнавания промоторов, а также на более поздних стадиях инициации транскрипции, включая инициацию синтеза РНК, уход РНКП с промотора и образование пауз транскрипции. Ранее в нашей лаборатории на примере сигма70-субъединицы *Escherichia coli* было показано, что в данных процессах участвует консервативный район 3.2 сигма-субъединицы, который позиционирует матричную цепь ДНК в активном центре РНКП, стимулирует связывание

инициаторных NTP (iNTP), а затем облегчает диссоциацию сигма-субъединицы за счет взаимодействий с синтезируемой РНК.

Мы исследовали роль района 3.2 сигма70-субъединицы *E. coli* во взаимодействиях РНКП с промотором *glnBP1* генов рРНК. Данный промотор формирует с РНКП крайне нестабильные комплексы, инициация транскрипции на нем зависит от концентрации инициаторных нуклеотидов и регулируется по механизму строгого контроля с участием белка *DksA* и алармона *ppGpp*. Нами показано, что мутации в районе 3.2 сигма-субъединицы РНКП сильно увеличивают стабильность комплексов РНКП с *glnBP1*-промотором, но незначительно влияют на связывание iNTP, в отличие от изученных ранее сильных промоторов. С другой стороны, мутации в районе 3.2 влияют на эффективность подавления транскрипции фактором *DksA* и *ppGpp* как *in vitro*, так и *in vivo*. Можно заключить, что район 3.2 играет ключевую роль в образовании нестабильных комплексов РНКП с промотором *glnBP1* и в регуляции синтеза рРНК на различных стадиях роста клеток.

С использованием флуоресцентно-меченых вариантов сигма70-субъединицы мы измерили кинетику перехода от инициации к элонгации транскрипции на разных промоторах (что сопровождается разрывом контактов сигма70 с -10 элементом промотора и изменением флуоресценции). Было показано, что мутации в районе 3.2 значительно снижают скорость ухода РНКП с промотора, а факторы *DksA* и *GreA*, связывающиеся во вторичном канале РНКП, способны увеличивать эффективность этого процесса.

Следующей задачей наших исследований было понять, какие функции выполняет район 3.2 в случае альтернативных сигма-субъединиц (сигма38, 32 и 28). Оказалось, что в случае всех перечисленных сигма-факторов делеция района 3.2 приводит к увеличению стабильности комплексов РНКП с соответствующими промоторами (в отличие от большинства промоторов сигма70). Также было показано, что фактор *DksA* способен увеличивать стабильность промоторных комплексов,

формируемых РНКП с сигма32- и 28-субъединицы, в отличие от комплексов, содержащих сигма70- и сигма38-субъединицы. Таким образом, роль района 3.2 сигма-субъединицы и механизмы регуляции транскрипции фактором DksA различны для главной и альтернативных сигма-субъединиц.

**Публикации Лаборатории молекулярной генетики
микроорганизмов (ОМГК):**

1. Miropolskaya N, Esyunina D, Kulbachinskiy A. Conserved functions of the trigger loop and Gre factors in RNA cleavage by bacterial RNA polymerases. *Journal of Biological Chemistry*. 2017 Apr 21;292(16):6744-6752.
2. Agapov A, Olina A, Esyunina D, Kulbachinskiy A. Gfh factors and NusA cooperate to stimulate transcriptional pausing and termination. *FEBS Lett*. 2017 Mar;591(6):946-953.
3. Petushkov I, Esyunina D, Kulbachinskiy A. σ 38-dependent promoter-proximal pausing by bacterial RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 2017 Dec 7. 45(6):3006-3016.
4. Petushkov I, Esyunina D, Kulbachinskiy A. Possible roles of σ -dependent RNA polymerase pausing in transcription regulation. *RNA Biol*. 2017 Aug 17:1-5.
5. Miropolskaya N, Petushkov I, Kulbachinskiy A, Makarova AV. Identification of amino acid residues involved in the drp-lyase activity of human Pol I. *Sci Rep*. 2017 Aug 31;7(1):10194.
6. Petushkov I, Esyunina D, Mekler V, Severinov K, Pupov D, Kulbachinsky A. Interplay between σ region 3.2 and secondary channel factors during promoter escape by bacterial RNA polymerase. *Biochem J*. 2017 Dec 1;474(24):4053-4064.
7. Yurieva O, Nikiforov V Jr, Nikiforov V, O'Donnell M, Mustaev A. Insights into RNA polymerase catalysis and adaptive evolution gained from mutational analysis of a locus conferring rifampicin resistance. *Nucleic Acids Res*. 2017 Nov 2;45(19):11327-11340.
8. Kazachenko KY, Miropolskaya NA, Gening LV, Tarantul VZ, Makarova AV. Alternative splicing at exon 2 results in the loss of the catalytic activity of mouse DNA polymerase iota in vitro. *DNA Repair (Amst)*. 2017 Feb;50:77-82.
9. Миндлин С.З., Петрова М.А. 2017. О происхождении и распространении устойчивости к антибиотикам: результаты изучения древних бактерий из многолетнемерзлых отложений.



Структура и функции бактериальных белков-аргонавтов

А.В. Кузьменко

Лаборатория биологии РНК и эпигенетики
(ЛБРИЭ)

Открытие РНК-интерференции произвело настоящую революцию в нашем понимании механизмов регуляции экспрессии генов. В основе данного процесса лежит взаимодействие коротких некодирующих РНК длиной 20-30 нт с комплементарными им РНК-мишенями, что может приводить к деградации мРНК или подавлению ее трансляции. Ключевую роль в процессах РНК-интерференции у эукариот играют белки-Аргонавты, которые образуют рибонуклеопротеиновый комплекс с короткими гидовыми РНК и осуществляют дальнейшее узнавание и разрезание молекулы-мишени. До недавнего времени подобные системы не были известны для прокариотических организмов. Однако несколько лет назад белки-Аргонавты были открыты и у бактерий. Несмотря на определенное сходство в работе бактериальных белков с системой РНК-интерференции эукариот, белки-Аргонавты бактерий могут функционировать в отсутствие дополнительных специализированных факторов, и при этом узнают не РНК, а ДНК-мишени. На сегодняшний день многие аспекты биогенеза гидовых РНК и ДНК, а также функционирования белков-Аргонавтов в клетках бактерий остаются неизвестными. Биоинформатический анализ геномных баз данных с целью поиска новых генов бактериальных Аргонавтов и ассоциированных с ними белков позволил нам идентифицировать более 800 представителей этого семейства, включая «длинные» и «короткие» Аргонавты, содержащие

полный или усеченный набор характерных для этого семейства доменов. Около 10 перспективных белков-Аргонавтов, относящихся к разным классам и различающихся по своим свойствам, были экспрессированы в гетерологической системе *E. coli*, выделены и очищены до гомогенности. Анализ ассоциированных с ними коротких нуклеиновых кислот показал, что различные белки способны связывать как короткие ДНК, так и РНК, при этом паттерн длин этих молекул индивидуален для каждого из белков. Полученные экспериментальные данные также свидетельствуют о наличии остатка фосфорной кислоты на 5'-конце коротких ДНК/РНК.

Все исследованные нами представители длинных, каталитически активных белков-Аргонавтов связываются только с молекулами коротких ДНК. Это означает, что данные белки-Аргонавты, скорее всего, используют ДНК-гиды для узнавания ДНК-мишеней. Действительно, анализ их активности в системе *in vitro* показал, что все они являются ДНК-зависимыми ДНК-нуклеазами и способны с высокой эффективностью осуществлять разрезание однострессовой ДНК. При этом уровень активности различных белков зависит от структуры гидовой ДНК, присутствия в реакции ионов двухвалентных металлов, ионной силы и температуры реакции. Стоит отметить, что способность описанных нами белков-Аргонавтов эффективно осуществлять программируемое разрезание ДНК-мишеней в диапазоне физиологических температур открывает перспективу для их дальнейшего использования в качестве инструмента для направленного редактирования генома клеток млекопитающих.



**Роль системы поли(АДФ-рибозил)ирования белков в
стресс-индуцированных реакциях клетки на патологические
воздействия**

С.И. Шрам¹, А.С. Ефремова¹, И.А. Недорубова¹,

**И.В. Кукушкина¹, А.Н. Хохлов², А.М. Сурин³, В.Г. Пинелис³,
Н.Ф. Мясоедов¹**

*¹Сектор нейрофармакологии Отдела химии физиологически
активных веществ (ОХФАВ), Институт молекулярной
генетики РАН*

*²Сектор эволюционной цитогеронтологии Биологического
факультета, Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова*

*³Лаборатория нейробиологии и фундаментальных основ
развития мозга Научного центра здоровья детей, МЗ РФ*

Поли(АДФ-рибозил)ирование (ПАРирование) белков является универсальной регуляторной системой эукариотической клетки. В норме она активно вовлечена в поддержание клеточного гомеостаза путем формирования и координации внутриклеточных процессов в условиях постоянно меняющегося генотоксического и цитотоксического фона. Однако, в условиях патологии эта система выполняет не только защитные функции, важнейшей из которых является поддержание целостности генома, но также вовлекается в реализацию различных деструктивных процессов, тесно сопряженных с хроническим окислительным стрессом (ОС) и воспалением. В ряде экспериментальных исследований было показано, что ингибирование ПАРирования белков значительно снижает морфологические и функциональные нарушения, развивающиеся при некоторых сердечно-сосудистых, неврологических и психических заболеваниях.

Целью наших исследований было выявить механизмы, посредством которых ПАРирование белков может влиять на процессы гибели клетки, клеточного старения (senescence) и формирование провоспалительного секреторного фенотипа, при некоторых распространенных кардиомиопатиях и патологиях головного мозга. В экспериментах на клеточных моделях кардиомиопатий было установлено, что активизация процесса ПАРирования белков вероятно является ключевым этапом гибели, старения и гипертрофии кардиомиоцитов при

кардиотоксическом действии Dox и сахарном диабете. Также было исследовано участие системы ПАРирования белков в регуляции внутриклеточного уровня Ca^{2+} и функционального состояния митохондрий в нейронах при индукции в них хронического ОС и глутаматной эксайтотоксичности (моделирование ишемии/реперфузии). Обнаружено, что вызываемые ОС нарушения ионного гомеостаза и функции митохондрий в нейронах тесно связаны с функционированием системы ПАРирования белков и, видимо, находятся под ее контролем. Полученные результаты указывают на перспективность рассмотрения системы ПАРирования белков в качестве потенциальной мишени для кардио- и нейропротекторной фармакотерапии при целом ряде распространенных заболеваний сердечно-сосудистой и нервной систем.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01870) и проекта Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (2014-2017гг).



Молекулярные аспекты нейрорегуляторной активности фармакологически важных пептидов

Т.В. Вьюнова

*Сектор регуляторных пептидов Отдела химии
физиологически активных веществ (ОХФВ)*

Уникальное сочетание биологических свойств нейропептидов – их полифункциональность, специфичность действия, высокая регуляторная активность и легкость последующей биodeградации в организме – открывает широкие возможности для создания на основе пептидов и их модифицированных аналогов различных лекарственных препаратов нейропротекторного и регуляторного действия.

Несмотря на существование и успешное применение лекарств на основе пептидов, механизм их биологического действия до конца не ясен. Нами предложен интегральный подход к изучению молекулярных аспектов механизма действия регуляторных пептидов, в частности – исследования процессов их влияния на аффинность и плотность локализации (на плазматических мембранах) рецепторов различных нейромедиаторных систем клеток мозга. В основе разрабатываемой системы скрининга молекулярно-биологической активности пептидов лежит метод радиолиганд - рецепторного анализа. Использование синтезированных в Отделе меченных тритием аналогов эндогенных лигандов различных нейрорецепторов позволяет количественно охарактеризовать изменения специфических межмолекулярных процессов на поверхности клеток-мишеней. С использованием описанного выше подхода были проведены, в частности, исследования ряда нейрорецепторных систем - проанализирована молекулярно-биологическая активность около десятка групп пептидов и их модификаций (пептиолипидов, охо-Pro и D-аминокислотных производных), исследовано сочетанное действие пептидов и непептидных эффекторных молекул. Полученные данные позволили сформулировать гипотезу, описывающую молекулярные аспекты механизма биологического действия регуляторных нейропептидов. Согласно предположению, механизм биологического действия исследуемых нейропептидов на молекулярном уровне может быть частично реализован за счет нелинейной дозо-зависимой аллостерической регуляции активности различных групп нейромедиаторных рецепторных комплексов. Для пептидов образующих синтактон, необходимо также учитывать множественные взаимодействия всех входящих в синактон пептидов с их молекулярными мишенями. Предложенная гипотеза нашла подтверждение при исследовании молекулярных аспектов биологического действия семакса и селанка. Проводимые в настоящее время исследования будут и далее продолжены и расширены, как с

точки зрения разнообразия применяемых в работе радиолигандов, так и сточки зрения увеличения количества направленно синтезируемых биологически активных молекул на основе пептидов и нейролипидов.



Экспериментальные модели патологий раннего развития: оценка возможности пептидергической коррекции

Е.А. Себенцова

*Лаборатория молекулярных основ регуляции поведения
Отдела физиологически активных веществ (ОФАВ)*

В период интенсивного развития мозг крайне уязвим для действия негативных факторов, что при генетической предрасположенности может привести к развитию функциональных расстройств и нарушений поведения, которые проявляются на протяжении всей жизни. Защита развивающегося мозга от неблагоприятных воздействий имеет большое значение в силу значительной распространенности патологий развития детей. Нарушения могут возникать в результате воздействия на мозг ребенка факторов различной природы, таких как перинатальная гипоксия, фармакологическое воздействие при применении во время беременности лекарственных средств, эмоциональная депривация (недостаточность контакта со взрослым) и другие. Распространенной патологией развития ребенка являются расстройства аутистического спектра (РАС), одной из возможных причин которых является нарушение созревания ЦНС в раннем периоде. Коморбидность аутизма, депрессии и эпилепсии вызывает большой интерес исследователей.

Клинические исследования последствий патологий раннего развития сопряжены с огромными трудностями. Большой вклад в изучение этой проблемы вносят эксперименты на животных. В связи с этим возникает вопрос о разработке

адекватных моделей таких патологий для изучения их нейрохимических механизмов и поиска путей коррекции последствий этих заболеваний. Адекватные модели перинатальных патологий должны имитировать условия, в которых такие повреждения происходят и отражать функциональные нарушения, наблюдаемые в клинике.

Основной задачей проводимых исследований являлось изучение последствий перинатальных воздействий различной природы в экспериментах на животных и поиск путей их коррекции. Нами разработаны модели для исследования последствий неонатального стресса, пренатального воздействия антидепрессантов группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина, острой неонатальной гипоксии, а также фармакологическая модель РАС. Сопоставление с клиническими данными показало адекватность используемых моделей. Показана возможность уменьшения негативных последствий неонатального стресса, неонатального воздействия антидепрессанта флувоксамина и неонатальной гипоксии последующим введением препарата семакс. Кроме того, показана способность регуляторных пептидов различных классов (семакс, казоморфин, фрагмент АВП) корректировать проявления фетального вальпроатного синдрома (фармакологическая модель РАС). Полученные эффекты, вероятно, определяются способностью регуляторных пептидов модулировать работу ряда нейромедиаторных систем, а также изменять уровень нейротрофических факторов.

Публикации Отдела химии физиологически активных веществ (ОХФАВ) (СН, СЭЦ, ЛНиФОРМ, СРП, ЛМОРП):

1. Markov DD, Yatsenko KA, Inozemtseva LS, Grivennikov IA, Myasoedov NF, Dolotov OV. Systemic N-terminal fragments of adrenocorticotropin reduce inflammation- and stress-induced anhedonia in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2017 Aug;82:173-186.
2. Medvedeva EV, Dmitrieva VG, Limborska SA, Myasoedov NF, Dergunova LV. Semax, an analog of ACTH((4-7)), regulates expression of immune

response genes during ischemic brain injury in rats. *Mol Genet Genomics* (Molecular Genetics and Genomics). 2017 Jun;292(3):635-653.

3. Vyunova TV, Andreeva LA, Shevchenko KV, Myasoedov NF. Synacton and individual activity of synthetic and natural corticotropins. *J Mol Recognit*. 2017 May;30(5). UNSP e2597.

4. Kasian A, Kolomin T, Andreeva L, Bondarenko E, Myasoedov N, Slominsky P, Shadrina M. Peptide Selank Enhances the Effect of Diazepam in Reducing Anxiety in Unpredictable Chronic Mild Stress Conditions in Rats. *Behav Neurol*. 2017;2017:5091027.

5. Filatova E, Kasian A, Kolomin T, Rybalkina E, Alieva A, Andreeva L, Limborska S, Myasoedov N, Pavlova G, Slominsky P, Shadrina M. GABA, Selank, and Olanzapine. Affect the Expression of Genes Involved in GABAergic Neurotransmission in IMR-32 Cells. *Front Pharmacol*. 2017 Feb 28;8:89.

6. Иванов А.В., Бобынцев И.И., Шепелева О.М., Крюков А.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние АКГГ4-7-PGP (семакса) на морфофункциональное состояние гепатоцитов в условиях хронического эмоционально-болевого стресса. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017. Т. 163. № 1. С. 123-127.

7. Шевченко К.В., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Андреева Л.А., Шрам С.И., Мясоедов Н.Ф. Проникновение 5-охо-рго-агг-рго в головной мозг и основные пути его метаболизма в мозге и крови крыс при интраназальном и внутривенном введении Доклады Академии наук. 2017. Т. 473. № 6. С. 742-745.

8. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Меченный тритием 5-ОХО-ПРО-АРГ-ПРО. Доклады Академии наук. 2017. Т. 473. № 5. С. 564-567.

9. Винюков А.В., Дмитриев М.Э., Афанасьев А.В., Рагулин В.В., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Синтез фосфинового р,₁γ-защищенного псевдопролилглицинового блока *Журнал общей химии*. 2017. Т. 87. № 2. С. 291-294.

10. Гусар В.А., Тимофеева А.В., Жанин И.С., Шрам С.И., Пинелис В.Г. Оценка временных паттернов экспрессии микроРНК в ткани головного мозга, плазме и лейкоцитах крови крыс в условиях фотоиндуцируемой ишемии. *Молекулярная биология*. 2017. Т. 51. № 4. С. 683-695.

11. Фоменко Е.В., Бобынцев И.И., Крюков А.А., Иванов А.В., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние селанка на функциональное состояние гепатоцитов крыс при иммобилизационном стрессе. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017. Т. 163. № 4. С. 407-410.

12. Кобылянский А.Г., Золотарёв Ю.А., Андреева Л.А., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф. Исследование токсических эффектов ряда биологически активных пептидов на модели эмбриональных стволовых клеток мыши. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163. № 6. С. 696-697.
13. Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Золотарев Ю.А., Липкин В.М., Завьялов В.П. Взаимодействие В-субъединицы холерного токсина с Т-лимфоцитами человека. Биохимия. 2017. Т. 82. № 9. С. 1330-1337.
14. Шиловский Г.А., Шрам С.И., Моргунова Г.В., Хохлов А.Н. Система поли(ADP-рибозил)ирования белков: изменения при развитии, старении и ограничении клеточной пролиферации// Биохимия. Т. 82, № 11 с. 1391-1401.
15. Вьюнова Т.В., Шевченко К.В., Андреева Л.А., Шевченко В.П., Радилев А.С., Дулов С.А., Петунов С.Г., Мясоедов Н.Ф. Энзиматическая устойчивость и возможные молекулярные мишени синтетического пептида HFRWPGR. Химико-фармацевтический журнал. 2017. Т. 51. № 5. С. 9-12.
16. Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Владимиров В.И., Золотарев Ю.А. А1-тимозин, А2-интерферон и синтетический пептид lkek ингибируют связывание b-субъединицы холерного токсина с мембранами эпителиальных клеток кишечника. Биоорганическая химия. 2017. Т. 43. № 6. С. 655-660.
17. Шевченко К.В., Безуглов В.В., Акимов М.Г., Нараев И.Ю., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. Синтез N-ацильных производных пептида PRO-GLY-PRO-LEU: протеолитическая устойчивость in vitro и влияние на клетки мышинных макрофагов RAW264.7. Доклады Академии наук. 2017. Т. 476. № 5. С. 596-599.
18. Богачук А.П., Сторожева З.И., Телегин Г.Б., Чернов А.С., Прошин А.Т., Шерстнев В.В., Золотарев Ю.А., Липкин В.М. Специфическая активность амидной формы пептида hldf-6: изучение на трансгенной модели болезни Альцгеймера Acta Naturae (русскоязычная версия). 2017. Т. 9. № 3 (33). С. 68-74.
19. Шевченко В.П., Вьюнова Т.В., Нараев И.Ю., Шевченко К.В., Мясоедов Н.Ф. Синтез меченного дейтерием или тритием ацетилхолина. Радиохимия. 2017. Т. 59. № 5. С. 456-460.
20. Сломинский П.А., Шадрин М.И., Коломин Т.А., Ставровская А.В., Филатова Е.В., Андреева Л.А., Иллариошкин С.Н., Мясоедов Н.Ф. Пептиды семакс и селанк влияют на поведение крыс в условиях экспериментальной модели болезни Паркинсона.

Доклады Академии наук. Т. 474. № 2. С. 264-267.

21. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А. Коррекция проявлений экспериментального метаболического синдрома у крыс с помощью некоторых аргининсодержащих пептидов. Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2017. Т. 72. № 2. С. 92-98.

22. Иноземцев А.Н., Бокиева С.Б., Карпухина О.В., Гумаргалиева К.З., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Парадоксальное влияние сочетанного воздействия семакса и молибдат аммония на обучение и память крыс. Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2017. Т. 72. № 3. С. 174-178.

23. Иванов А.В., Бобынцев И.И., Шепелева О.М., Крюков А.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Морфологические изменения печени крыс при стрессе и их особенности при ведении семакса. Морфология. 2017. Т. 151. № 1. С. 39-43.

24. Шепелева О.М., Иванов А.В., Бобынцев И.И., Крюков А.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние Актг4-7-рgr (семакса) на морфологию печени крыс в условиях острого эмоционально-болевого стресса. Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. 2017. № 3. С. 81-85.

25. Шилковский Г.А., Шрам С.И., Хохлов А.Н. Антивозрастная медицина и поли(адp-рибоза)-полимеразы: активировать или ингибировать? Клиническая геронтология. 2017. Т. 23. № 9-10. С. 76-78.

26. Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А. Исследование влияния регуляторных пептидов на липидный профиль, уровень глюкозы крови и массу тела крыс при развитии экспериментального метаболического синдрома. Современные проблемы науки и образования. 2017. № 3. С. 23.

27. Толстенок И.В., Лебедько О.А., Андреева Л.А., Иннокентьев А.А., Флейшман М.Ю. Влияние аргининсодержащего глипролгерегенсеина PRPGP на синтез ДНК и свободнорадикальное окисление в слизистой оболочке желудка белых мышей на модели индометацин-индуцируемого язвообразования. Тихоокеанский медицинский журнал. 2017. № 3. С. 50-53.28. Соллертинская Т.Н., Шорохов М.В., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А. Пластичность мозга: пептидные биорегуляторы в терапевтической коррекции мнестических, психозмоциональных расстройств и межполушарной асимметрии мозга у млекопитающих. Журнал «Асимметрия». 2017. Т. 11. № 2. С.19-37.

29. Мясоедов Н.Ф., Ляпина Л.А., Андреева Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Шубина Т.А. Оксопролиновые короткие пептиды –

потенциальные фармакологические средства гиполипидемического и антитромботического действия //Биомедицинская химия, 2017. Т. 63, вып. 6. С. 546-552.

30. Савельева Е.М., Гетман И.А., Ломин С.Н., Ословский В.Е., Курочкин Н.Н., Михайлов С.Н., Сидоров Г.В., Романов Г.А. Исследование особенностей взаимодействия широкого ряда цитокинин-подобных лигандов с рецепторами цитокининов *Arabidopsis Thaliana*.

В сборнике: рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей Международной конференции. 2017. С. 887-892.

31. Myasoedov, N.F., Grigorjeva, M.E., Lyapina, L.A., Obergan, T.Y., Andreeva, L.A. Metabolic syndrome: Correct effects of regulatory peptides on hemostasis and metabolic processes// *Metabolic Syndrome: Clinical Aspects, Management Options and Health Effects*, January 2017, Pages 45-60. ISBN: 978-153610701-2. Nova Science Publishers, Inc.



Функциональная роль и механизмы действия летучих органических соединений, синтезируемых микроорганизмами.

В.А. Плюта

*Лаборатория регуляции экспрессии генов микроорганизмов
(ЛГЭГМ)*

В последнее время большой интерес вызывает способность микроорганизмов синтезировать летучие органические соединения различной химической природы (ЛОС). Изучение функциональной роли и механизмов действия ЛОС – это новое актуальное направление в микробиологии и в тех областях биологии, в которых объектами исследования являются микроорганизмы. Это направление открывает мало изученные аспекты конкурентных отношений между микроорганизмами и закономерности их взаимодействия с высшими организмами. Кроме большого фундаментального значения, изучение ЛОС может обеспечить перспективы их использования на практике - в медицине, биотехнологии и с/х. Недавно была опубликована база данных идентифицированных

ЛОС (более 2000), продуцируемых бактериями и грибами. Среди бактериальных ЛОС преобладают кетоны, спирты, терпены, кислоты, углеводороды, серо- и азот-содержащие соединения. ЛОС способны подавлять рост микроорганизмов, модулировать рост растений, влиять на синтез вторичных метаболитов, могут функционировать как сигналы дистанционной коммуникации нового типа между различными организмами. Функциональная роль и механизмы действия ЛОС на различные биологические объекты изучены слабо.

Объектами нашей работы являются ЛОС, образуемые почвенными бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*. ЛОС были идентифицированы с помощью методов газовой хроматографии и масс-спектрометрии; в наибольшем количестве бактерии синтезировали кетоны, алкен ундецен, диметилдисульфид (ДМДС). Было показано, что суммарные газовые смеси, выделяемые бактериями, и индивидуальные ЛОС оказывали ингибиторное действие на агробактерии, в том числе, образующие биопленки, цианобактерии, фитопатогенные грибы, нематоды, дрозофилы и растения. Впервые было установлено, что ЛОС бактерий подавляют функционирование Quorum Sensing систем регуляции экспрессии генов бактерий. Действие изученных ЛОС не вызывало окислительный стресс и снижало транскрипцию с промоторов генов *katG*, *soxS* и *oxyS*, индуцируемых окислительным стрессом. Было показано, что ЛОС ингибируют рефолдинг термоинактивированных бактериальных люцифераз в клетках *E. coli* (особенно у мутанта без шаперона *IbpB*). С целью выяснения механизмов действия ЛОС получены транспозонные мутанты цианобактерий, устойчивые к действию кетонов; локализованы гены, определяющие устойчивость к 2-нонанону. Проведенный протеомный анализ (на модели мха *Physcomitrella patens*) показал, что 2-нонанон оказывает плейотропное действие на экспрессию белков.

Планируется проведение работ по изучению молекулярно-генетических механизмов действия ЛОС с различной химической структурой на микроорганизмы.

**Публикации Лаборатории регуляции экспрессии генов
микроорганизмов (ЛГЭГМ):**

1. Melkina OE, Khmel IA, Plyuta VA, Koksharova OA, Zavilgelsky GB. Ketones 2-heptanone, 2-nonanone, and 2-undecanone inhibit DnaK-dependent refolding of heat-inactivated bacterial luciferases in *Escherichia coli* cells lacking small chaperon IbpB. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017 Jul;101(14):5765-5771.
2. Rtimi S, Nadtochenko V, Khmel I, Kiwi J. Evidence for differentiated ionic and surface contact effects driving bacterial inactivation by way of genetically modified bacteria. *Chem Commun (Camb)*. 2017 Aug 10;53(65):9093-9096.
3. Тимофеева А.В., Ташлицкий В.Н., Ткачев А.Г., Баратова Л.А., Кокшарова О.А. Наноконплексы на основе Таунита, связанного с биоцидами, как эффективные анти-цианобактериальные агенты. *Российский журнал физиологии растений*. V. 64. N 6. P. 833-838.
4. S.Rtimi, V. Nadtochenko, I. Khmel, M. Bensimon, J. Kiwi. First unambiguous evidence for distinct ionic and surface-contact effects during photocatalytic bacterial inactivation on Cu-Ag films: Kinetics, mechanism and energetics // *Materials Today Chemistry*, 2017, 6, 62-74.



**Специфичность выбора спейсеров при CRISPR-адаптации в
CRISPR-Cas системе типа I-E у *Escherichia coli***

Е.Е. Савицкая

*Лаборатория регуляции экспрессии генов мобильных
элементов прокариот (ЛРЭГМЭП)*

CRISPR-Cas системы иммунитета прокариот состоят из CRISPR кассет, представляющих собой уникальные спейсеры, разделенные короткими повторами, и ассоциированных с ними генов *cas*. Транскрипция и процессинг CRISPR кассеты приводит к образованию коротких крПНК, каждая из которых содержит один спейсер, окруженный фрагментами повторов. крПНК образуют комплекс с продуктами генов *cas*, который узнает участки нуклеиновых кислот (ДНК или РНК), комплементарные

спейсеру крПНК, и инициирует деградацию соответствующих молекул в процессе CRISPR-интерференции. Разнообразие интерференционных комплексов, часто неродственных друг другу, используется для классификации CRISPR-Cas систем. В настоящее время выделяют 2 класса и 6 типов. Новые спейсеры встраиваются в CRISPR-кассету в процессе, получившем название CRISPR-адаптация. Белки Cas1 и Cas2, обеспечивающие CRISPR-адаптацию, консервативны между системами различных типов и классов. У *Escherichia coli*, имеющей систему типа I-E, белки Cas1 и Cas2 образуют комплекс в соотношении 4:2, который способен встраивать ДНК-фрагменты в CRISPR-кассету. Интересно, что на фоне CRISPR-интерференции CRISPR-адаптация идет намного эффективнее, а большинство спейсеров происходят из деградируемой молекулы ДНК. Такое явление получило название праймированной CRISPR-адаптации. Каким образом фрагменты-предшественники спейсеров образуются *in vivo*, какова специфичность адаптационного комплекса к фрагментам с различной структурой и нуклеотидной последовательностью остается недостаточно изученным.

В нашей лаборатории при изучении CRISPR-Cas системы типа I-E у *E. coli* были получены данные свидетельствующие о том, что фрагменты, предшественники спейсеров, могут представлять собой одноцепочечные фрагменты длиной более 100 нуклеотидов. При изучении CRISPR-адаптации с использованием плазмидных библиотек, в которых участки одного из преспейсеров были рандомизованы, удалось установить нуклеотидные последовательности, влияющие на эффективность встраивания, а также компоненты CRISPR-Cas системы, отвечающие за наблюдаемую специфичность. Сочетания биоинформатического анализа и методов машинного обучения позволяет предсказывать сравнительные частоты выбора фрагментов для встраивания в CRISPR-кассету. В целом, полученные результаты способствуют пониманию механизмов CRISPR-адаптации, а также могут быть использованы в биотехнологических прикладных направлениях,

использующих данные механизмы.

**Публикации Лаборатории регуляции экспрессии генов
мобильных элементов прокариот (ЛРЭГМЭП):**

1. Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, Fedorova I, Kneppers J, DeGennaro EM, Winblad N, Choudhury SR, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Wu WY, Scott DA, Severinov K, van der Oost J, Zhang F. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nat Biotechnol.* 2017 Jan;35(1):31-34.
2. Metelev M, Arseniev A, Bushin LB, Kuznedelov K, Artamonova TO, Kondratenko R, Khodorkovskii M, Seyedsayamdost MR, Severinov K. Acinetodin and Klebsidin, RNA Polymerase Targeting Lasso Peptides Produced by Human Isolates of *Acinetobacter gyllenbergii* and *Klebsiella pneumoniae*. *ACS Chem Biol.* 2017 Feb 3. 12(3):814-824.
3. Musharova O, Klimuk E, Datsenko KA, Metlitskaya A, Logacheva M, Semenova E, Severinov K, Savitskaya E. Spacer-length DNA intermediates are associated with Cas1 in cells undergoing primed CRISPR adaptation. *Nucleic Acids Res.* 2017 Apr 7. 45(6):3297-3307.
4. Lavysch D, Sokolova M, Slashcheva M, Förstner KU, Severinov K. Transcription Profiling of *Bacillus subtilis* Cells Infected with AR9, a Giant Phage Encoding Two Multisubunit RNA Polymerases. *MBIO.* 2017 Feb 14;8(1): e02041-16.
5. Strotskaya A, Savitskaya E, Metlitskaya A, Morozova N, Datsenko KA, Semenova E, Severinov K. The action of *Escherichia coli* CRISPR-Cas system on lytic bacteriophages with different lifestyles and development strategies. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 26. 45(9):1946-1957.
6. Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Makarova KS, Wolf YI, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Mar;15(3):169-182.
7. Xu RG, Jenkins HT, Chechik M, Blagova EV, Lopatina A, Klimuk E, Minakhin L, Severinov K, Greive SJ, Antson AA. Viral genome packaging terminase cleaves DNA using the canonical RuvC-like two-metal catalysis mechanism. *Nucleic Acids Res.* 2017. 45(6):3580-3590.
8. Savitskaya E, Lopatina A, Medvedeva S, Kapustin M, Shmakov S, Tikhonov A, Artamonova II, Logacheva M, Severinov K. Dynamics of *Escherichia coli* type I-E CRISPR spacers over 42 000 years. *Mol Ecol.* 2017 Apr;26(7):2019-2026.
9. Sokolova M, Borukhov S, Lavysch D, Artamonova T, Khodorkovskii M, Severinov K. A non-canonical multisubunit RNA polymerase encoded by the

AR9 phage recognizes the template strand of its uracil-containing promoters. Nucleic Acids Res. 2017 Jun 2;45(10):5958-5967.

10. Popova AV, Lavysh DG, Klimuk EI, Edelstein MV, Bogun AG, Shneider MM, Goncharov AE, Leonov SV, Severinov KV. Novel Fri1-like Viruses Infecting Acinetobacter baumannii-vB_AbaP_AS11 and vB_AbaP_AS12-Characterization, Comparative Genomic Analysis, and Host-Recognition Strategy. Viruses-Basel. 2017 Jul 17;9(7). pii: E188.

11. Shmakov SA, Sitnik V, Makarova KS, Wolf YI, Severinov KV, Koonin EV. The CRISPR Spacer Space Is Dominated by Sequences from Species-Specific obilomes. MBio. 2017 Sep 19;8(5). pii: e01397-17.

12. Martynov A, Severinov K, Ispolatov I. Optimal number of spacers in CRISPR arrays. PLoS Comput Biol. 2017 Dec 18;13(12):e1005891.

13. Petushkov I, Esyunina D, Mekler V, Severinov K, Pupov D, Kulbachinsky A. Interplay between σ region 3.2 and secondary channel factors during promoter escape by bacterial RNA polymerase. Biochem J. 2017 Dec 1;474(24):4053-4064.



Поиск молекулярных мишеней и механизмов, связанных с развитием депрессии: между моделью и пациентом

М.И. Шадрина

Лаборатория молекулярной генетики наследственных болезней (ЛМГНБ)

Клиническая депрессия является одним из наиболее распространённых и тяжелых типов аффективных расстройств. По оценке ВОЗ, от этого заболевания в мире страдает примерно 350 миллионов человек. Семейные и близнецовые исследования показали, что в развитие депрессии могут вносить свой вклад генетические факторы - но не описаны моногенные формы депрессивных расстройств. Начиная с 1978 г. во всем мире было проведено значительное число работ по поиску генов, вовлеченных в развитие этого заболевания с использованием различных методических подходов (анализ кандидатных генов, полногеномный ассоциативный анализ, полногеномное секвенирование) и было выявлено большое

число ассоциаций с разными клиническими вариантами и субфенотипами депрессии. Однако в большинстве случаев выявляемые ассоциации не подтверждались в репликативных исследованиях и в настоящее время можно говорить только о небольшом количестве генов, для которых ассоциация с риском развития депрессии считается доказанной. В связи с этим необходимо продолжать поиск генетических факторов, вовлеченных в патогенез депрессии. При этом крайне важно дополнить проводимые ассоциативные исследования наследуемых вариантов генома анализом динамических изменений, происходящих в организме в процессе развития депрессивных расстройств. Однако возможности исследования изменений транскриптома, протеома и эпигенома при депрессии ограничены самой природой заболевания и необходимостью анализа ткани головного мозга, возможной только post-mortem. Исходя из этого, любые исследования по изучению патогенеза депрессивных расстройств у человека должны быть дополнены экспериментами на различных моделях депрессии на животных. Это позволит оценить весь процесс формирования депрессивного состояния на разных уровнях организации нервной ткани и при выявлении интересных с точки зрения патогенеза заболевания молекулярных процессов вернуться к их анализу у пациентов с депрессией. В связи с этим нами проводится комплексное исследование механизмов развития депрессии, основанное на сочетании изучения развития депрессии при ее моделировании на экспериментальных животных с анализом полиморфизма ДНК в группах больных с различными фенотипическими проявлениями заболевания

Публикации Лаборатории молекулярной генетики наследственных болезней (ЛМГНБ):

1. Kasian A, Kolomin T, Andreeva L, Bondarenko E, Myasoedov N, Slominsky P, Shadrina M. Peptide Selank Enhances the Effect of Diazepam in Reducing Anxiety in Unpredictable Chronic Mild Stress Conditions in Rats. Behav Neurol. 2017;2017:5091027.

2. Filatova E, Kasian A, Kolomin T, Rybalkina E, Alieva A, Andreeva L, Limborska S, Myasoedov N, Pavlova G, Slominsky P, Shadrina M. GABA, Selank, and Olanzapine. Affect the Expression of Genes Involved in GABAergic Neurotransmission in IMR-32 Cells. *Front Pharmacol.* 2017 Feb 28;8:89.
3. Shulskaya MV, Shadrina MI, Fedotova EY, Abramychева NY, Limborska SA, Illarionov SN, Slominsky PA. Second mutation in PARK2 is absent in patients with sporadic Parkinson's disease and heterozygous exonic deletions/duplications in parkin gene. *Int J Neurosci.* 2017 Sep;127(9):781-784.
4. McLaughlin RL, Schijven D, van Rheenen W, van Eijk KR, O'Brien M, Kahn RS, Ophoff RA, Goris A, Bradley DG, Al-Chalabi A, van den Berg LH, Luyckx JJ, Hardiman O, Veldink JH; Project MinE GWAS Consortium; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Genetic correlation between amyotrophic lateral sclerosis and schizophrenia. *Nat Commun.* 2017 Mar 21;8:14774.
5. Dorokhov, Vladimir B.; Puchkova, Alexandra N.; Taranov, Anton O.; Slominskii P. et al. A pilot replication study of two PER3 single nucleotide polymorphisms as potential genetic markers for morning and evening earliness-lateness. *Biological rhythm research.* 2017. V. 48, N 4, P. 531-540.
6. Alieva, Anelya Kh.; Filatova, Elena V.; Kolacheva, Anna A.; et al. Transcriptome Profile Changes in Mice with MPTP-Induced Early Stages of Parkinson's Disease. *Molecular neurobiology.* Nov 2017. V. 54. N 9. P. 6775-6784.
7. Filatova EV, Alieva AK, Shadrina MI, Slominsky PA. Differences in relative levels of 88 microRNAs in various regions of the normal adult human brain. *Microna.* 2017. Aug 16;6(2):125-135.
8. Дорохов В.Б., Пучкова А.Н., Таранов А.О., Ермолаев В.В., Тупицына Т.В., Сломинский П.А., Дементенко В.В. Полиморфизмы генов, связанных со сном и когнитивными функциями, и их ассоциация с аварийностью у работающих посменно водителей автобусов. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова* 2017. Т. 67, 1, 49-54.
9. Крюкова Е.В., Шелухина И.В., Колачева А.А., Алиева А.Х., Шадрина М.И., Сломинский П.А., Кашеверов И.Е., Уткин Ю.Н., Угрюмов М.В., Цетлин В.И. Возможное участие нейрональных никотиновых ацетилхолиновых рецепторов в компенсаторных механизмах мозга на ранних стадиях болезни Паркинсона. *Биомедицинская химия.* 2017. Т. 63. № 3. С. 241-247.

10. Таранов А.О., Пучкова А.Н., Сломинский П.А., Тупицына Т.В., Дементенко В.В., Дорохов В.Б. Ассоциации хронотипа, аварийности и полиморфизмов генов, связанных с биологическими часами и дофаминергической системой. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017. Т. 117. № 4-2. С. 28-33.

11. Сломинский П.А., Шадрина М.И., Коломин Т.А., Ставровская А.В., Филатова Е.В., Андреева Л.А., Иллариошкин С.Н., Мясоедов Н.Ф. Пептиды семакс и селанк влияют на поведение крыс в условиях экспериментальной модели болезни Паркинсона.

Доклады Академии наук 2017. Т. 474. № 2. С. 264-267.

12. Константинова О.В., Аполихин О.И., Сивков А.В., Сломинский П.А., Тупицына Т.В., Калиниченко Д.Н. Значение молекулярно-генетических методов при поиске факторов риска множественных камней почек у больных уролитиазом в российской популяции

Урологические ведомости. 2017. Т. 7. № спецвыпуск. С. 55-56.

13. Аполихин О.И., Сивков А.В., Константинова О.В., Сломинский П.А., Тупицына Т.В., Калиниченко Д.Н. Ранняя диагностика риска развития кальций-оксалатной формы мочекаменной болезни. Урология. 2017. № 3. С. 5-9.

14. Аполихин О.И., Сивков А.В., Константинова О.В., Сломинский П.А., Тупицына Т.В., Калиниченко Д.Н. Роль методов молекулярной генетики в прогнозировании развития кальций- оксалатного уролитиаза. В сборнике: Молекулярная диагностика 2017. Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2017. С. 33-34. Издательство: ООО фирма «Юлис».

15. Шадрина М.И., Алиева А.Х., Росинская А.В., Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А.

Экспрессионное профилирование периферической крови при болезни Паркинсона: поиск РНК-маркеров заболевания В сборнике: Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей по материалам IV Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений (с международным участием). Под редакцией С.Н. Иллариошкина, О.С. Левина. 2017. С. 85-89.

16. Шульская М.В., Зырин В.В., Федотова Е.Ю., Абрамычева Н.Ю., Пчелина С.Н., Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А., Шадрина М.И. Полноэкзомное секвенирование в изучении генетических основ болезни Паркинсона. В сборнике: Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей по материалам IV Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений (с

международным участием). Под редакцией С.Н. Иллариошкина, О.С. Левина. 2017. С. 52-55.



Эволюционная история популяций субарктического трансуральского региона

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

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

Уральский регион, как пограничная зона между Европой и Азией, и населяющие его народы всегда были предметом большого интереса, как биологов, так и антропологов. Популяции, живущие по обе его стороны, сочетают в своем внешнем облике как европейские, так и азиатские черты. Традиционно, уральские этнические группы рассматривались антропологами как общности, возникшие в результате долговременного смешения азиатских и европейских популяций. Однако известный советский антрополог В.В. Бунак, исходя из необычности наблюдаемых у уральцев, особенно их северных представителей (манси, ханты, ненцы), антропологических комплексов, предположил, что они являются потомками отдельной эволюционной линии, формировавшейся достаточно независимо от европейской и монголоидной ветвей. Следы этих процессов, очевидно, должны были сохраняться в геномах людей, населяющих территории трансуральского региона.

В рамках нашей работы были секвенированы полные геномы 28 индивидов из 14 этнических групп восточной Европы и Сибири (средняя глубина покрытия 38x) и сравнены с 76 геномами современных людей и людей предыдущих эпох из различных популяций и регионов мира. Моделирование и оценка генетических взаимоотношений между представителями популяций проводилось с использованием программ TreeMix, AdmixTools и MSMC. В ходе анализа моделей было

установлено, что более половины (57%) присущей ханты, манси и ненцам генетической вариативности восходит к древним северным евразийцам, жившим 17-24 тыс. лет назад (представлены костными останками с позднепалеолитических стоянок Афонтова гора и Мальта, расположенных на юге Сибирского федерального округа). Вторая же ее часть (43%) происходит от смешения с некоей древней восточносибирской популяцией, наиболее близкой к современным эвенкам, с которой предки современных манси, ханты и ненцев вступили в контакт 7-9 тысяч лет назад. Таким образом, можно предполагать, что именно двухкомпонентность генома, складывавшаяся в своей основе на древневразийском (протазиа́тском) субстрате, отличает уральцев от других сибирских популяций, в частности, восточносибирских. Последние, к тому же, являются эволюционно более молодыми (выделение восточносибирских популяций как самостоятельной группы из общего пула восточноазиатских популяций произошло около 10 тыс. лет назад). По результатам комплексного анализа также предполагается, что предки манси и ханты (но не ненцев) сыграли важную роль в становлении генофондов населения значительной части восточной Европы.



Исследование изменений работы генов при развитии заболеваний и под действием пептидных препаратов

***В.Г. Дмитриева, В.В. Ставчанский, И.Б. Филиппенков,
А.В. Рожкова, Е.В. Носова,***

О.Ю. Сударкина, С.А. Лимборская, Л.В. Дергунова

Лаборатория функциональной геномики Отдела молекулярных основ генетики человека (ОМОГЧ)

Пептидные препараты, основанные на природных регуляторных пептидах, перспективны для коррекции нарушений, возникающих при патологических состояниях, однако молекулярные механизмы их действия не до конца понятны и требуют изучения. С использованием современных

технологий полногеномного анализа продолжено изучение механизма действия семакса на клетки мозга крыс в условиях реперфузионной модели ишемии, наиболее полно отражающей ишемический инсульт у человека. С помощью метода RNASeq проведен поиск дифференциально экспрессирующихся генов в подкорковых структурах мозга крыс, где формируется очаг повреждения. Из более 17 тысяч исследованных генов под воздействием семакса в подкорковых структурах мозга крыс с ишемией через 24 после операции изменили экспрессию 654. С использованием биоинформатического ресурса DAVID проведена функциональная аннотация этих генов и выявлены сигнальные пути, в которых они участвуют. Дифференциально экспрессирующиеся гены были ассоциированы с 25 сигнальными путями, преимущественно связанными с нейросигнализацией и воспалением. При этом на экспрессию отдельных генов в подкорковых структурах нейропептид оказал компенсаторный эффект, обратный воздействию повреждения. С помощью Вестерн-блот анализа показано подавляющее действие семакса на активность семейства JNK киназ, активирующихся при гипоксии, оксидативном и эксайтотоксическом стрессе и регулирующих активацию целого спектра транскрипционных факторов. Обнаруженное нами ингибирующее действие семакса на гены, участвующие в воспалении, а также на JNK киназы, схоже с действием меланоцитстимулирующего гормона в условиях ишемии. Мы предполагаем, что ряд генов, участвующих в работе нейромедиаторных систем и при воспалении, обеспечивающих компенсаторный эффект семакса в условиях обратимой ишемии, могут являться неизвестными ранее потенциальными мишенями воздействия пептида.

С целью изучения молекулярных механизмов атеропротективной роли липопротеинов высокой плотности (ЛВП) на транскриптомном уровне проведен поиск генов, вовлеченных в атерогенез у пациентов с ишемической болезнью сердца. С использованием первичных данных полногеномных исследований базы GEO и базы Reactome выявлена

вовлеченность 60 генов в биологические процессы, связанные с метаболизмом липопротеинов, обратным транспортом холестерина и развитием воспаления. Проведено сравнительное исследование уровня экспрессии основных генов метаболизма липопротеинов в мононуклеарных клетках крови 35 пациентов с широко-варьирующим содержанием холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛВП). В клетках пациентов с высоким содержанием ХС-ЛВП относительно лиц с низким содержанием ХС-ЛВП обнаружено значимое снижение содержания мРНК генов ЛНП-рецептора (*LDLR*); транспортеров холестерина из клеток (*ABCA1*, *SCARB1*); фермента лецитин-холестерин ацилтрансферазы (*LCAT*) и печеночной липазы (*LIPC*). Предложены механизмы действия обнаруженных изменений при дислипидемии.

Публикации Отдела молекулярных основ генетики человека (ОМОГЧ) (ЛМГЧ, ЛФГ):

1. Filippenkov IB, Kalinichenko EO, Limborska SA, Dergunova LV. Circular RNAs-one of the enigmas of the brain. *Neurogenetics*. 2017 Jan;18(1):1-6.
2. Wong EH, Khrunin A, Nichols L, Pushkarev D, Khokhrin D, Verbenko D, Evgrafov O, Knowles J, Novembre J, Limborska S, Valouev A. Reconstructing genetic history of Siberian and Northeastern European populations. *Genome Res*. 2017. Jan;27(1):1-14.
3. Filatova E, Kasian A, Kolomin T, Rybalkina E, Alieva A, Andreeva L, Limborska S, Myasoedov N, Pavlova G, Slominsky P, Shadrina M. GABA, Selank, and Olanzapine. Affect the Expression of Genes Involved in GABAergic Neurotransmission in IMR-32 Cells. *Front Pharmacol*. 2017 Feb 28;8:89.
4. Medvedeva EV, Dmitrieva VG, Limborska SA, Myasoedov NF, Dergunova LV. Semax, an analog of ACTH((4-7)), regulates expression of immune response genes during ischemic brain injury in rats. *Mol Genet Genomics*. 2017 Jun;292(3):635-653.
5. Shulskaya MV, Shadrina MI, Fedotova EY, Abramycheva NY, Limborska SA, Illarionov SN, Slominsky PA. Second mutation in PARK2 is absent in patients with sporadic Parkinson's disease and heterozygous exonic deletions/duplications in parkin gene. *Int J Neurosci*. 2017 Sep;127(9):781-784.

6. Stavusis J, Inashkina I, Lace B, Pelnena D, Limborska S, Khrunin A, Kucinskas V, Krumina A, Piekuse L, Zorn B, Fodina V, Punab M, Erenpreiss J. A New Baltic Population-Specific Human Genetic Marker in the PMCA4 Gene. Hum Hered. 2016 -2017;82(3-4):140-146.

7. Хрунин А.В., Хворых Г.В. // Комплексная генетическая история популяций северо-востока Европы и Западной Сибири.// Историческая демография. 2017. № 2. С. 81-85.



Измерения альфа-сателлита Глобальный взгляд на альфа-сателлитные повторы центромер

В.А. Шепелев

Лаборатория биоинформатики

Центромеры большинства приматов, в т.ч. человека, состоят из центрального гомогенного домена альфа-сателлита (АС) и окружающих его старых дивергентных слоев АС. В человеческой линии нами выявлено около 20 таких предковых слоев, каждый из которых, вероятно, соответствует предковой филогенетической группе. В результате многолетней работы нами (совместно с НЦПЗ и ИОГен РАН) построена схема всеобъемлющей морфо-функциональной классификации АС, где структурные характеристики последовательности АС используются для предсказания ее функциональных свойств (участие в формировании кинетохора, структура хроматина, транскрипция и т.д.). Выделено 6 основных морфо-функциональных классов АС, так что по результатам анализа последовательности каждый известный домен может быть отнесен к одному из классов или (в сложных случаях) обозначен как кандидат в 2 класса. Такой уровень понимания для центромерного повтора многоклеточного организма достигнут впервые.

Разнообразие форм организации АС может быть рассмотрено как многомерное пространство, где различные измерения

представляют собой структурные и функциональные характеристики АС. Три основных измерения – это центромерный статус (живая или мертвая центромера), старый или новый АС и, наконец, наличие или отсутствие ПЕВП (мономерная или сложная структура повтора). В качестве очень важных дополнительных измерений можно назвать дивергенцию, хромосомную специфичность, локализацию, транслокацию и т.д.

Каждое из этих измерений имеет свою динамику в филогенетической истории приматов и в жизненном цикле индивидуальной центромеры от рождения до смерти.

Так в филогении, в человеческой линии у ранних приматов преобладали мономерные гомогенные центромеры, одинаковые на всех хромосомах. На смену им у высших приматов пришли сложные хромосом-специфичные повторы. В жизни индивидуальной центромеры основными вехами являются рождение в борьбе (амплификация и вытеснение старой центромеры), годы на престоле, умирание (вытеснение новой центромерой и превращение в мертвую центромеру) и посмертная деградация, которая имеет несколько этапов. Возможна также «жизнь после жизни», когда исчезнувшая центромера оставляет после себя след в виде сегментных дупликаций (которые могут не иметь АС).



Роль белка TRIM14 в формировании противовирусных реакций врожденного иммунитета

В.В. Ненашева

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

В последние годы установлено, что белки семейства TRIM играют важную роль в процессах врожденного иммунитета, в первую очередь, в антивирусной защите

организма. Существует высокая специфичность в антивирусной активности различных членов семейства TRIM. Это в значительной мере связано с тем, что TRIM белки участвуют в различных противовирусных механизмах, связанных с разнообразием вирусов, на которые они нацелены. TRIM14, впервые описанный нами, привлек в последнее время пристальное внимание исследователей, так как было обнаружено, что он активно способствует защите организма от различных патогенов. Цель нашего исследования заключалась в изучении влияния TRIM14 на вирус гриппа А (IAV). IAV– высоко инфекционный респираторный патоген, который вызывает сезонные эпидемии и периодические глобальные пандемии с очень высокими уровнями заболеваемости и смертности. Когда IAV попадает в клетки, стимул-специфические сигналы передаются по сигнальному интерфероновому пути для активации антивирусных реакций. Когда интерфероновый ответ не может контролировать репликацию IAV, клетки активируют вторичный антивирусный ответ через запрограммированную смерть (апоптоз).

В своем исследовании мы показали, что TRIM14 ингибирует репродукцию IAV как *in vitro* (в клетках A549), так и *in vivo* (на двух полученных нами линиях трансгенных мышей с геном *TRIM14* человека). Повышенная экспрессия гена *TRIM14* способствовала выживанию двух независимых линий трансгенных животных при заражении IAV. По нашим данным, защитный эффект гена TRIM14 связан главным образом с повышением уровня интерферонов (ИФН), которое наблюдалось как в клетках с повышенной экспрессией гена *TRIM14*, так и в легких трансгенных мышей, и последующим запуском сигнального интерферонового пути. Интересно, что после IAV инфекции через 12-72 ч наблюдалось значительное уменьшение транскрипции генов ИФН в клетках A549 с гиперэкспрессией гена *TRIM14* по сравнению с контрольными клетками и уменьшение уровня транскрипции ИФН в легких, селезенке и печени у трансгенных мышей обеих линий по сравнению с контрольными животными. Эти данные

коррелируют с нашими ранее полученными данными о влиянии гена *TRIM14* на экспрессию генов ИНФ при инфекции вирусом Синдбис клеточной культуры HEK293. В клетках A549 с нокдауном эндогенного гена *TRIM14* наблюдалось повышение транскрипции ИФН через 24-72 ч после инфекции IAV, что подтверждает участие *TRIM14* в этом процессе. Такая регулирующая роль гена *TRIM14* была выявлена нами впервые и может иметь значение для сбалансированной работы иммунной системы при вирусной инфекции.

Исследование влияния *TRIM14* на апоптоз и некроз в ходе вирусной инфекции показало, что при защите от инфекции IAV ген *TRIM14* регулирует процессы апоптоза на ранних стадиях инфекции (24 ч) через подавление сигнального пути гена *BAX*.

Таким образом, наши данные, полученные на моделях *in vivo* и *in vitro*, свидетельствуют об активном участии *TRIM14* в процессах врожденной иммунной системы, происходящих в клетке при заражении вирусом гриппа, и механизмах его действия.



Нейрональные производные ИПСК *in vivo* и *in vitro*, особенности и перспективы использования

Е.В. Новосадова

*Лаборатория молекулярной генетики соматических клеток
Отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики
(ОВКМГ)*

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) являются одной из главных проблем современной неврологии. Для подавляющего большинства НДЗ характерен длительный латентный период развития и прогрессирующее течение, приводящее к выраженной инвалидизации пациентов. В настоящее время в мире разрабатывается ряд подходов в

терапии НДЗ, при этом основные усилия сосредоточены на создании нейропротекторной среды для снижения гибели или замены уже утраченных нейронов. Это можно осуществить либо путем стимулирования эндогенного нейрогенеза, либо трансплантацией нейрональных клеток с последующей интеграцией их в соответствующие структурно–функциональные церебральные сети. Для решения этих задач в настоящее время активно используют индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) человека. Крайне важным является изучение дегенеративных изменений в нейронах в процессе их дифференцировки, что стало возможным только с получением ИПСК. Возможность влиять на процесс нейродегенерации замедляя, либо полностью предотвращая его, позволит выйти на принципиально новый уровень лечения НДЗ.

В нашей работе были исследованы нейрональные клетки разной степени зрелости пациентов со спорадическими и наследственными формами болезни Паркинсона, а также здоровых доноров. Был изучен профиль экспрессии нейронспецифических, про- и антиапоптотических генов, что позволило нам выявить не только дифференциально экспрессирующиеся гены двух групп доноров, но и определить зависимость уровня экспрессии от стадии зрелости получаемых нейронов. В работе также была изучена возможность влияния пептидов семейства меланокортинов на уровень экспрессии нейронспецифических генов. Показано, что длительное культивирование нейронов в присутствии данных пептидов стимулирует процесс образования дофаминергических нейронов, как в клетках здоровых доноров, так и пациентов с болезнью Паркинсона.

Было изучено влияние трансплантированных нейрональных клеток в стриатум крыс с 6-OHDA-моделью паркинсонизма. Показано, что клетки после нейротрансплантации сохраняют свою локализацию в стриатуме и остаются жизнеспособными до 4 месяцев после операции, при этом наблюдалось распространение их отростков и формирование контактов с стриатными нейронами экспериментальных животных.

Животные через 3 недели после нейротрансплантации демонстрировали стабильное повышение двигательной активности в «открытом поле», к концу 6 недели у них полностью регрессировали мышечная ригидность, гипокинезия, нарушения позы и птоз. Проведенное исследование показывает принципиальную возможность коррекций нарушений моторики у экспериментальных животных за счет репопуляции дофаминергических нейронов, полученных из ИПСК человека.



Изучение роли меланокортиновой системы в стрессовом ответе и развитии депрессивных состояний

О.В. Долотов

*Лаборатория молекулярной генетики соматических клеток
Отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики
(ОВКМГ)*

Продуцирующийся в гипофизе и состоящий из 39 аминокислот пептид аденокортикотропный гормон (АКТГ) является ключевым участником нейроэндокринного стрессового ответа организма, и его основная роль состоит в стимуляции выброса глюкокортикоидов из коры надпочечников при активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС). АКТГ активирует пять подтипов меланокортиновых (МС) рецепторов, но его кортикотропная активность реализуется путем активации меланокортиновых рецепторов второго подтипа (МС2), и ответственным за нее является N-концевой регион 1-16 молекулы АКТГ. Недостаточно эффективная саморегуляция активности ГГНС глюкокортикоидами по принципу отрицательной обратной связи рассматривается как одна из причин развития ряда связанных со стрессом патологий, таких как депрессия, а терапевтические эффекты применяемых антидепрессантов связаны с восстановлением ее эффективности. Для АКТГ также была показана способность

негативно регулировать активность ГГНС на уровне гипоталамуса, но МС2-рецепторы отсутствуют в мозге, что указывает на осуществление этой регуляции через другие подтипы МС-рецепторов. Более короткие, чем 1-16 N-концевые фрагменты АКТГ, не обладая способностью активировать МС2-рецепторы, способны активировать другие подтипы МС-рецепторов, и это позволяет предполагать у них наличие способности нормализовать активность ГГНС. Нами были изучены эффекты АКТГ(1-13) (α -меланоцитстимулирующий гормон, α -МСГ), АКТГ(4-10) и его аналога Семакс в условиях непредсказуемого хронического стресса, вызывающего у животных хроническую гиперстимуляцию ГГНС и являющегося широко применяемой моделью депрессии. Системное введение крысам данных пептидов в дозе 60 нмоль/кг нормализовало вызванное стрессированием снижение массы тела, предотвращало гипертрофию надпочечников и развитие ядерного симптома депрессии - ангедонии (снижение способности испытывать удовольствие). В условиях острой активации ГГНС индуктором воспаления липополисахаридом (ЛПС) системное введение α -МСГ и АКТГ(4-10) ослабляло ангедонию, но не влияло на вызванные воспалением снижение аппетита, потребление корма и массы тела и индуцированную экспрессию в мозге основных медиаторов воспаления. Одновременное введение с АКТГ(4-10) (агонист МС3- и МС5-рецепторов), соединения SHU9119 (антагониста МС3- и МС4- / агониста МС1- и МС5-рецепторов), блокировало вызванное АКТГ(4-10) снижение стимулированных ЛПС уровней кортикостерона и TNF- α в крови, что указывает на вовлеченность МС3-рецепторов в эффекты пептидов. Полученные данные свидетельствуют о ранее неизвестной защитной роли АКТГ и α -МСГ при стрессовом ответе и об антидепрессантоподобной активности некортикотропных N-концевых фрагментов АКТГ в стрессовой и воспалительной моделях депрессии. В то же время, механизмы реализации этих эффектов остаются неясными, и в дальнейших исследованиях планируется поиск вызываемых данными пептидами изменений

в профиле экспрессии генов в мозге животных в моделях депрессии и изучение в моделях *in vitro* и *in vivo* механизмов регуляции данными пептидами активности ГГНС.

Публикации Отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики (ОВКМГ) (ЛРиРГ, ЛМГСК):

1. Nenasheva V. V., Novosadova E. V., Makarova I. V., O. S. Lebedeva, M. A. Grefenshtein E. L. Arsenyeva S. A. Antonov, I. A. Grivennikov, V. Z. Tarantul. The Transcriptional Changes of trim Genes Associated with Parkinson's Disease on a Model of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Molecular neurobiology*. Nov 2017. V. 54. N 9. P. 7204-7211.
2. Novosadova E.V., Manuilova E.S., Arsenyeva E.L., Tarantul V.Z., Illarioshkin S.N., Grivennikov I.A. Fibroblast-Like Cells Derived from iPS Cells of Patients with the Familial forms of Parkinson's Disease can Serve an Effective Feeder for Derivation and Cultivation of New iPS Cells Lines. *J. Stem Cell Res. Ther.* 2017, 3(3): 00102.
3. Kazachenko KY, Miropolskaya NA, Gening LV, Tarantul VZ, Makarova AV. Alternative splicing at exon 2 results in the loss of the catalytic activity of mouse DNA polymerase iota *in vitro*. *DNA Repair (Amst)*. 2017 Feb;50:77-82.
4. Markov DD, Yatsenko KA, Inozemtseva LS, Grivennikov IA, Myasoedov NF, Dolotov OV. Systemic N-terminal fragments of adrenocorticotropin reduce inflammation- and stress-induced anhedonia in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2017 Aug;82:173-186.
5. Новосадова Е.В., Арсеньева Е.Л., Мануилова Е.С., Хаспеков Л.Г., Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Иллариошкин С.Н., Гривенников И.А. Исследование нейротекторных свойств эндоканнабиноидов парахиноидофамин и N-докозагексаеноидофамин на нейрональных предшественниках человека, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. *Биохимия*. 2017. Т. 82. № 11. С. 1732-1739.
6. Захарчева К.А., Генинг Л.В., Казаченко К.Ю., Тарантул В.З. Клетки, устойчивые к токсическим концентрациям ионов марганца, обладают повышенной способностью к репарации ДНК // *Биохимия*. 2017. Т. 82. № 1. С. 101-110.
7. Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н., Новосадова Е.В., Гривенников И.А. Экспрессия каннабиноидных рецепторов 1-го типа на этапах нейрональной дифференцировки

фибробластов человека. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163. № 2. С. 242-245.

8. Кобылянский А.Г., Золотарёв Ю.А., Андреева Л.А., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф. Исследование токсических эффектов ряда биологически активных пептидов на модели эмбриональных стволовых клеток мыши. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163. № 6. С. 696-697.

9. Ставровская А.В., Новосадова Е.В., Ямщикова Н.Г., Ольшанский А.С., Гущина А.С., Коновалова Е.В., Гривенников И.А., Иллариошкин С.Н. Оценка эффектов клеточной терапии на воспроизведение условного рефлекса пассивного избегания у крыс с хинолининдуцированной моделью болезни гентингтона Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2017. Т. 11. № 2. С. 32-37.

10. Ветчинова А.С., Иллариошкин С.Н., Новосадова Е.В., Абрамычева Н.Ю., Хаспеков Л.Г., Гривенников И.А. Искусственная нуклеазная система CRISPR/CAS9 как инструмент для изучения моногенных форм болезни Паркинсона. Сибирское медицинское обозрение, 106, № 4, 53-58. (2017).

11. Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Ольшанский А.С., Гущина А.С., Новосадова Е.В., Гривенников И.А., Иллариошкин С.Н. Экспериментальные подходы к нейротрансплантации на моделях экстрапирамидных заболеваний В сборнике: Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей по материалам IV Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений (с международным участием). Под ред. С.Н. Иллариошкина, О.С. Левина. 2017. С. 56-60.

12. Новосадова Е.В., Некрасов Е.Д., Честков И.В., Сурдина А.В., Васина Е.М., Богомазова А.Н., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Симонова В.В., Коновалова Е.В., Федотова Е.Ю., Абрамычева Н.Ю., Хаспеков Л.Г., Гривенников И.А., Тарантул В.З., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки в моделировании и исследовании механизмов патогенеза болезни Паркинсона. В сборнике: Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей по материалам IV Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений (с международным участием). Под ред. С.Н. Иллариошкина, О.С. Левина. 2017. С. 25-28.



Зачем бактериям протеализинподобные протеазы?

И.В. Демидюк

Лаборатория функциональной энзимологии Отдела молекулярно-генетических основ биотехнологии и белковой инженерии (ОМГОбуБИ)

Протеализинподобные протеазы (ППП) – группа пептидаз, относящихся к семейству М4. Ферменты этой группы широко распространены у эубактерий, а также обнаружены у грибов и некоторых архей. Биологические функции ППП практически не изучены. В то же время для отдельных ферментов получены данные, которые указывают на то, что ППП вовлечены во взаимодействие бактерий с высшими организмами и патогенез. Так, по-видимому, ППП участвуют в проникновении бактерий в клетки млекопитающих, могут подавлять противобактериальную защиту насекомых, а также являются факторами, вовлеченными в разрушение бактериями тканей животных и растений.

Изучение прототипа группы – протеализина из *Serratia proteamaculans* – позволило нам получить новые данные о функционировании ППП. Анализ бактериальных геномов продемонстрировал, что гены ППП входят в состав оперонов. Кроме протеаз опероны кодируют небольшие консервативные белки с неизвестной функцией. В ходе исследований такого белка из *S. proteamaculans* было установлено, что он является эффективным ингибитором ППП и, по-видимому, имеет внутриклеточную локализацию. Так как ранее на модели протеализина было показано, что ППП синтезируются и накапливаются в клетках в виде неактивного предшественника, а активируются лишь после выхода из клетки, можно предположить, что ингибитор необходим для подавления активности ППП, которые попадают в бактериальную клетку извне.

Тандем протеаза-ингибитор напоминает пары токсин-иммунный белок, типичные для систем, участвующих в межбактериальной конкуренции, таких, например, как система секреции типа VI или система контактного ингибирования роста. Это позволяет выдвинуть гипотезу о вовлеченности ППП не только во взаимодействия бактерий с высшими организмами, но и в конкурентную борьбу бактерий. Таким образом, ППП, по-видимому, важны для выживания бактерий в различных экологических нишах.



Трансплантационные модели организменного уровня на основе *Danio rerio*

Д.Р. Сафина

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

Разработка биологических моделей, позволяющих открывать новые подходы к изучению природы возникновения и прогрессии злокачественных новообразований и увеличивать эффективность поиска путей противоопухолевой терапии, остается одной из актуальных проблем современной онкологии. В этом плане в последние 10 лет все более популярной моделью в онкологических исследованиях становится пресноводная рыба *Danio rerio*. Это обусловлено такими особенностями данного организма, как небольшие размеры (2,5-4 см), короткий жизненный цикл, возможность получать от одной самки до нескольких сотен икринок в неделю, развитие *ex utero*, прозрачность эмбрионов и личинок, относительная легкость содержания и разведения, а также наличие множества мутантных и трансгенных линий.

В Лаборатории белковой инженерии ведутся работы по созданию трансплантационной опухолевой модели на основе *Danio rerio*, предназначенной для исследования молекулярных и клеточных механизмов, вовлеченных в контроль взаимодействия опухоли с окружающей тканью. С этой целью:

- собраны и поддерживаются лабораторные популяции *Danio rerio*, в том числе оптически транспарентных линий, необходимых для проведения работ;
- отработана технология трансплантации опухолевых клеток человека в развивающийся эмбрион *Danio rerio*. В качестве трансплантатов используются перевиваемые клетки линии HEK293 (эмбриональные клетки почки человека), трансфицированные ДНК-конструкцией, содержащей ген красного флуоресцентного белка, а также модифицированные раковые клетки линии A431 (эпидермоидная карцинома кожи человека), геном которых содержит ген люциферазы светлячка *Photinus pyralis*. Используемые маркеры позволяют анализировать персистенцию трансплантированных опухолевых клеток в ходе развития эмбриона;
- начаты эксперименты по индукции опухолей на основе флуоресцентно меченых сублиний клональной линии CG2 *Danio rerio*. Этот подход направлен на конструирование маркированных опухолей рыб для аллогенной трансплантации в пределах клональной линии.

Разрабатываемая модель позволит анализировать ряд ключевых элементов злокачественного роста, таких как метастазирование, инвазия или ангиогенез, на организменном уровне с применением техники аллогенной и ксеногенной трансплантации в сочетании с использованием оптически транспарентных линий *Danio rerio*.



**Противоопухолевая эффективность комбинации
суицидальной и иммунной генной терапии**

И.В. Алексеенко

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

Суицидальная генная терапия (СГТ) основана на доставке в опухолевые клетки суицидальных генов, ответственных за *in situ* превращение пролекарства в токсин. СГТ потенциально универсальна и низкотоксична, поскольку токсин образуется непосредственно в раковых клетках и специфически ингибирует репликацию ДНК. Однако СГТ имеет недостатки, связанные в том числе с трудностями в доставке терапевтической ДНК в раковые клетки. Одним из способов повышения эффективности СГТ является комбинирование суицидальных генов с генами системы регуляции иммунного ответа, наиболее перспективными из которых являются гены цитокинов, в частности GM-CSF и гены лигандов иммунных контрольных

точек (ИКТ). Ранее мы продемонстрировали, что введение в опухоль комбинации суицидального гена HSVtk и гена цитокина GM-CSF обеспечивает более высокий уровень подавления роста опухоли и метастазирования, чем введение конструкций, содержащих одиночные гены. В настоящем исследовании мы впервые показали, что добавлении к комбинации HSVtk-GM-CSF гена OX40L обеспечивает синергизм действия, что выражается в значимом повышении противоопухолевой эффективности как в отношении метастазирующих, так и неметастазирующих опухолей. Оценку эффективности совместной экспрессии генов HSVtk, GM-CSF и OX40L проводили по степени торможения опухоли (Т/С): синергизм действия, если $T/C[TKmGM+OX40L] < T/C[TKmGM] * T/C[OX40L]$, где $T/C[TKmGM+OX40L]$ эффект совместной экспрессии трех генов, $T/C[TKmGM]$ – эффект экспрессии генов HSVtk и mGM-CSF и $T/C[OX40L]$ – эффект экспрессии гена OX40L в опухоли. В ходе эксперимента был выявлен синергизм действия HSVtk, GM-CSF и OX40L, о чем свидетельствуют

значения показателя Степень торможения опухоли в группе мышей с привитой карциномой C26, получивших экспрессионные конструкции, несущие три гена HSVtk, GM-CSF и OX40L составила 0,165, для мышей с привитой S37 - 0,108, которые меньше произведения эффектов применения конструкций, несущих гены HSVtk и GM-CSF или OX40L (для C26: $T/C[TKmGM]^* T/C[OX40L] = 0,42*0,64=0.27$, для S37: $T/C[TKmGM]^* T/C[OX40L] = 0,46*0,72=0.33$). Такой вариант воздействия на опухоль посредством комбинации суицидальных генов и генов регуляции иммунного ответа открывает новые перспективы лечения злокачественных новообразований различных локализаций, как в качестве самостоятельного метода, так и в качестве дополнения к существующей стандартной терапии.

Публикации Отдела молекулярно-генетических основ биотехнологии и белковой инженерии (ОМГОБиБИ) (ЛФЭ, ЛБИ, СГО):

1. Демидюк И.В., Чухонцева К.Н., Костров С.В. Глутамилэндопептидазы: загадка субстратной специфичности. Acta Naturae. 2017. Т. 9. № 2 (33). С. 18-34.
2. Шубин А.В., Лесовая Е.А., Кирсанов К.И., Антошина Е.Е., Труханова Л.С., Горькова Т.Г., Белицкий Г.А., Якубовская М.Г., Демидюк И.В. Резкаменация модели плоскоклеточного рака пищевода крыс, индуцированного предшественниками этилового эфира N-нитрозосаркозина. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 164. № 11. С. 633-642.
3. Dvortsov IA, Lunina NA, Chekanovskaya LA, Gromov AV, Schwarz WH, Zverlov VV, Velikodvorskaya GA, Demidyuk IV, Kostrov SV. Carbohydrate binding module CBM28 of endoglucanase Cel5D from Caldicellulosiruptor bescii recognizes crystalline cellulose. Int J Biol Macromol. 2017 Sep 6. pii: S0141-8130(17)30821-8. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.165.
4. Komissarov A, Demidyuk I, Safina D, Roschina M, Shubin A, Lunina N, Karaseva M, Kostrov S. Cytotoxic effect of co-expression of human hepatitis A virus 3C protease and bifunctional suicide protein FCU1 genes in a bicistronic vector. Mol Biol Rep. 2017 Aug;44(4):323-332.

5. Heinze S, Mechelke M, Kornberger P, Liebl W, Schwarz WH, Zverlov VV. Identification of endoxylanase XynE from *Clostridium thermocellum* as the first xylanase of glycoside hydrolase family GH141. *Sci Rep*. 2017 Sep 11;7(1):11178.
6. Mechelke M, Koeck DE, Broecker J, Roessler B, Krabichler F, Schwarz WH, Zverlov VV, Liebl W. Characterization of the arabinoxylan-degrading machinery of the thermophilic bacterium *Herbinix hemicellulosilytica*-Six new xylanases, three arabinofuranosidases and one xylosidase. *J Biotechnol*. 2017 Sep 10;257:122-130.
7. Berezina OV, Herlet J, Rykov SV, Kornberger P, Zavyalov A, Kozlov D, Sakhibgaraeva L, Krestyanova I, Schwarz WH, Zverlov VV, Liebl W, Yarotsky SV. Thermostable multifunctional GH74 xyloglucanase from *Myceliophthora thermophila*: high-level expression in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant protein. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017 Jul;101(14):5653-5666.
8. Herlet J, Kornberger P, Roessler B, Glanz J, Schwarz WH, Liebl W, Zverlov VV. A new method to evaluate temperature vs. pH activity profiles for biotechnological relevant enzymes. *Biotechnology for Biofuels*. 2017 Oct 11;10:234. doi: 10.1186/s13068-017-0923-9. eCollection 2017.
9. Mechelke M, Herlet J, Benz JP, Schwarz WH, Zverlov VV, Liebl W, Kornberger P. HPAEC-PAD for oligosaccharide analysis-novel insights into analyte sensitivity and response stability. *Anal Bioanal Chem*. 2017 Dec;409(30):7169-7181.
10. Leis, B; Held, C; Bergkemper, F; Dennemarck, K; Steinbauer, R; Reiter, A ; Mechelke, M; Moersch, M; Graubner, S; Liebl, W; Schwarz, WH; Zverlov, VV. Comparative characterization of all cellulosomal cellulases from *Clostridium thermocellum* reveals high diversity in endoglucanase product formation essential for complex activity. *Biotechnology for Biofuels*. Oct 23, 2017. V.10. N 240.
11. Maus I, Bremges A, Stolze Y, Hahnke S, Cibis KG, Koeck DE, Kim YS, Kreubel J, Hassa J, Wibberg D, Weimann A, Off S, Stantscheff R, Zverlov VV, Schwarz WH, König H, Liebl W, Scherer P, McHardy AC, Sczyrba A, Klocke M, Pühler A, Schlüter A. Genomics and prevalence of bacterial and archaeal isolates from biogas-producing microbiomes. *Biotechnol Biofuels*. 2017 Nov 13;10:264.



**Роль специализированных ДНК-полимераз человека в
защите клеток от повреждений ДНК и мутагенезе**

А.В. Макарова

Группа «Специализированные ДНК-полимеразы» (ГСДП)

ДНК постоянно подвергается повреждениям, возникающим под действием разнообразных физических и химических факторов. Повреждения нарушают работу высокоточных ДНК-полимераз (ДНКП) и блокируют репликацию, что приводит к остановке клеточного цикла, хромосомной нестабильности и гибели клеток. Повреждения удаляются из геномной ДНК несколькими системами репарации с помощью ферментов ДНК-гликозилаз, экзо- и эндонуклеаз, специализированных ДНКП, ДНК-лигаз и др. Вторым уровнем защиты клеток от повреждений, которые не были удалены до очередного раунда репликации, являются механизмы, обеспечивающие толерантность клеток к повреждениям ДНК. Ключевую роль в этих механизмах играет целый ряд специализированных ДНК-полимераз, которые эффективно включают нуклеотиды напротив повреждений ДНК, но демонстрируют низкую точность синтеза на неповрежденной ДНК. Активность специализированных ДНК-полимераз является одним из основных механизмов мутагенеза в клетках эукариот.

Нарушение функций специализированных ДНКП у человека является фактором риска развития онкологических заболеваний. Специализированные ДНКП играют также важную роль в развитии устойчивости опухолей к химиотерапии и лучевой терапии. Действие ионизирующего излучения и многих препаратов химиотерапии направлено на повреждение ДНК и ингибирование репликации и деления опухолевых клеток. Поэтому, как в механизмах нарушения генетической стабильности и канцерогенеза, так и в механизмах развития резистентности опухолевых клеток к препаратам химиотерапии и лучевой терапии, важную роль играет эффективность систем защиты клеток от повреждений ДНК с участием специализированных ДНКП.

В докладе будут рассмотрены последние мировые достижения в области исследований механизмов работы специализированных ДНКП, в том числе исследования, которые потенциально могут найти применение в диагностике или терапии онкологических заболеваний. В докладе также будут представлены начатые в 2017 году ГСДП исследования полиморфизмов и мутаций специализированных ДНК-полимераз человека и получение аптамеров-ингибиторов ДНКП эта (Polη) человека.

Публикации Группы «Специализированные ДНК-полимеразы»
(ГСДП):

1. Kazachenko KY, Miropolskaya NA, Gening LV, Tarantul VZ, Makarova AV. Alternative splicing at exon 2 results in the loss of the catalytic activity of mouse DNA polymerase iota in vitro. DNA Repair (Amst). 2017 Feb;50:77-82.
2. Boldinova EO, Wanrooij PH, Shilkin ES, Wanrooij S, Makarova AV. DNA Damage Tolerance by Eukaryotic DNA Polymerase and Primase PrimPol. Int J Mol Sci 2017 Jul 21;18(7). pii: E1584.
3. Miropolskaya N, Petushkov I, Kulbachinskiy A, Makarova AV. Identification of amino acid residues involved in the dRP-lyase activity of human Pol ι. Sci Rep. 2017 Aug 31;7(1):10194.
4. Boldinova EO, Stojkovič G, Khairullin R, Wanrooij S, Makarova AV. Optimization of the expression, purification and polymerase activity reaction conditions of recombinant human PrimPol. PLoS One. 2017 Sep 13;12(9):e0184489.
5. Игнатов А.В., Бондаренко К.А., Макарова А.В. Необъемные повреждения ДНК у человека: пути образования, репарации и репликации. 2017. Т. 9. № 3 (33). С. 13-28.