



ACCELLENA

R E S E A R C H

**3-я ежегодная конференция
Института Трансляционной Биомедицины
СПбГУ
(ИТБМ СПбГУ)**

**«Актуальные проблемы трансляционной
биомедицины - 2017»**

Сборник тезисов

**15-16 июля
Санкт-Петербург
2017**

ДИА•М
современная лаборатория

helicon



Роль репликации ДНК в механизмах экспансии теломерных повторов.

Аксенова А.Ю.¹ и Миркин С.М.²

1 - Санкт-Петербургский Государственный Университет, лаборатория Биологии амилоидов, РФ;

*2 - Университет Тафтса, США
e-mail: aksena@gmail.com*

Теломерные повторы являются одними из самых динамичных последовательностей в геноме – они способны спонтанно изменять свою длину (претерпевать экспансии и контракции), индуцировать мутагенез и хромосомные перестройки. Экспансии дрожжевых теломерных повторов, как мы показали, в первую очередь зависят от работы систем пострепликативной репарации ДНК и гомологической рекомбинации. Однако ключевые компоненты этих систем практически не влияют на экспансии человеческих теломерных повторов в дрожжевой модели. Полученные нами данные указывают на то, что экспансии человеческих теломерных повторов в большей степени зависят от точности репликации ДНК и стабильности вилки репликации. В частности, нами установлено, что мутации в гене *POL2*, оказывающие влияние на селекцию нуклеотидов в активном сайте ДНК-полимеразы эпсилон, снижают частоту экспансий человеческих теломерных повторов. Эти мутации затрагивают А-мотив ДНК-полимеразы эпсилон (нуклеотид-связывающий карман) и приводят к характерным мутациям в ДНК, обусловленными повышенной частотой формирования некоторых неканонических пар в ДНК. Существенное снижение частоты экспансий теломерных повторов наблюдается также в штамме, где ген *POL2* находится под регулируемым ТЕТ промотером и его экспрессия нарушена. А в штаммах с делецией генов, кодирующих некаталитические субъединицы ДНК-полимеразы эпсилон *Dpb3* и *Dpb4*, частота экспансий наоборот повышена. В совокупности наши результаты указывают на ключевую роль ДНК-полимеразы эпсилон в механизмах экспансии человеческих теломерных повторов, причем в качестве основного механизма мы предполагаем проскальзывание ДНК-полимеразы эпсилон на матрицах особого рода, к которым относятся теломерные повторы. Наши данные имеют принципиальное значение для понимания механизмов репликации теломерной ДНК и механизмов альтернативного удлинения теломер в клетках человека.

Публикации по теме проекта:

Anna Y. Aksenova, Gil Han, Alexander A. Shishkin, Kirill V. Volkov and Sergei M. Mirkin
Expansion of interstitial telomeric repeats in yeast. 2015 Cell Reports 13(8) 1545–1551 doi:
10.1016/j.celrep.2015.10.023

Anna Y. Aksenova, Patricia W. Greenwell, Margaret Dominska, Alexander A. Shishkin, Jane C. Kim, Thomas D. Petes, and Sergei M. Mirkin; Genome rearrangements caused by interstitial telomeric sequences in yeast. 2013 PNAS 110 (49) 19866-19871. doi:
10.1073/pnas.1319313110 (Comment in Gazy and Kupiec PNAS 2013 Dec 3;110(49):19664-5. doi: 10.1073/pnas.1320030110)



Anna Aksenova, Kirill Volkov, Jaroslaw Maceluch, Zachary Pursell, Igor Rogozin, Thomas Kunkel, Youri Pavlov, Erik Johansson. Mismatch Repair-independent increase in spontaneous mutagenesis in yeast lacking non-essential subunits of DNA polymerase ϵ . 2010 PLoS Genetics 18;6(11) doi: 10.1371/journal.pgen.1001209



Изучение генетических основ ответа на физическую нагрузку у человека.

Алавердян Д. А., Пакин В.С., Глотов О.С., Полякова И.В., Швед Н.Ю.,
Мамаева О.П.

На сегодняшний день, благодаря развитию и возрастающей доступности новых технологий, сформирован стойкий интерес к использованию молекулярно-генетических методов при подготовке профессиональных спортсменов. Ввиду специфических особенностей энергетического обмена в организме атлета при выполнении физических нагрузок с различной интенсивностью и продолжительностью стало возможным с большой долей вероятности выявить генетические детерминанты, регулирующие тренировочный процесс.

Цель исследования заключалась в изучении генетических факторов, обуславливающих механизмы адаптаций к физическим нагрузкам, ответственных за энергетическое обеспечение мышечной деятельности у 78 спортсменов 18-25 лет различного уровня тренированности и разных направленностей.

Для изучения механизмов формирования адаптаций к нагрузкам были выбраны генетические маркеры, способные оказать прямое или косвенное влияние на метаболизм в результате физической нагрузки, на проявление скоростно-силовых качеств и выносливости. С помощью ПЦР-ПДРФ анализа были определены генотипы по 9 генам: *ACE* (I/D, rs4340) – гена, регулирующего кровяное давление, *PPARA* (G/C, rs2016520), *PPARD* (+294T/C, rs2016520), *PPARG* (Pro12Ala, rs1801282) – генов, вовлеченных в обмен холестерина, углеводов и окисление жирных кислот, *PPARGC1A* (Gly482Ser, rs8192678) – гена-коактиватора транскрипционных факторов и рецепторов эстрогена и минералокортикоидов, *AMPD1* (Gln12Ter, rs17602729) – гена, ответственного за энергетический метаболизм скелетных мышц во время мышечной деятельности, *ACTN3* (R577X, rs1815739) – гена, определяющего тип мышечных волокон, а также генов дофаминового и серотонинового рецепторов: *DRD-2A* (A1/A2, rs1800497), *HTR2A* (T/C, rs6313).

Результаты. Нами были установлено, что у спортсменов с генотипом *PPARGC1A* A/A (Ser/Ser) более высокий уровень холестерина (p-value=0,004), триглицеридов (p-value=0,042) и ЛПВП (p-value=0,012) в крови по сравнению с носителями генотипов G/G (Gly/Gly) и G/A (Ser/Gly). Наши результаты подтверждают данные о том, что генотип *PPARGC1A* A/A способствует сниженной скорости метаболизма холестерина, триглицеридов и ЛПВП в организме человека. Также мы установили, что в группе футболистов, хоккеистов и регбистов (статические нагрузки умеренной интенсивности и динамические нагрузки высокой интенсивности) частота генотипа T/T по гену *HTR2A* выше по сравнению с другими группами спортсменов. Таким образом, можно предположить, что носители T аллеля и генотипа T/T характеризуются меньшей скоростью развития усталости и большей выносливостью. И, кроме того,



высокой плотностью серотониновых рецепторов, обусловленной как повышенной экспрессией данного гена, так и регулярными физическими нагрузками.

Делеция Alu-повтора в гене *ACE* приводит к повышению экспрессии гена. Мы установили, что у спортсменов с генотипом D/D по гену *ACE* уровень диастолического АД в покое выше по сравнению с генотипами I/D и I/I ($p\text{-value}=0,017$). Мы подтвердили функциональную ассоциацию гена *ACE* с уровнем АД: генотип D/D обуславливает более высокий уровень фермента в крови и более высокое АД. Кроме того, генотип D/D ассоциирован с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний, что может представлять особенную опасность при занятиях спортом.

Заключение. Молекулярно-генетические методы, используемые в современных лабораториях, доказали свою пользу при оценке потенциала развития физических качеств. Было доказано, что различные аллели генов, контролирующих ключевые функции энергетического обмена, имеют отличия в профиле экспрессии.



Исследование острого введения агониста TAAR5-рецептора α -NETA на моноаминергические системы мозга мышей в гипоталамусе и стриатуме.

Антонова К.А.¹, Ефимова Е.В.¹, Суханов И.С.², Гайнетдинов Р.Р.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет,
Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербург,
² Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П.Павлова,
Институт фармакологии им. А.В. Вальдмана, Санкт-Петербург,
e-mail: krezistina@gmail.com;

В ходе метаболизма классических медиаторов (серотонина, дофамина, норадrenalина) образуются структурно похожие соединения - следовые амины. Следовые амины были открыты около ста лет назад; известна их роль в физиологии беспозвоночных (Grandy 2007), при этом о вовлеченности в осуществление каких-либо функций у млекопитающих известно крайне мало. Однако, имеются данные об изменении уровня следовых аминов в крови и моче у пациентов, страдающих психическими расстройствами (Davis and Boulton 1994). Новым этапом в изучении роли следовых аминов в функционировании нервной системы стало открытие и клонирование нового семейства GPCRs, ассоциированных со следовыми аминами (trace amine-associated receptors, TAARs) в 2001 году (Borowsky et al. 2001). Более детальное изучение данных рецепторов, при совмещении различных экспериментальных подходов, позволит оценить вероятную вовлеченность следовых аминов и ассоциированных с ними рецепторов в функционирование нервной системы и развитие различных патологий. На настоящий момент наиболее изученными рецепторами следовых аминов являются рецепторы TAAR1, в то время как о роли других типов рецепторов, в том числе TAAR5, известно крайне мало.

Ранее в нашей лаборатории были проведены поведенческие тесты на мышах, нокаутных по гену TAAR5 рецепторов. В тесте Порсольты у нокаутов, по сравнению с контрольной группой, были снижены показатели депрессивно-подобного поведения, что позволяет предположить модулирующее действие TAAR5 рецепторов на системы классических моноаминов.

Для изучения функций TAAR5 рецепторов и их потенциальной взаимосвязи с моноаминергическими системами мозга нами было использовано вещество α -NETA, для которого, с помощью метода BRET, была показана селективная активность на TAAR5 рецепторы.

Нами был проведен хроматографический анализ для измерения уровня моноаминов и их метаболитов в структурах мозга мышей (гипоталамус, стриатум) после острого введения селективного агониста TAAR5 α -NETA. Данный анализ



показал, что уровень норадреналина в гипоталамусе и стриатуме после введения α -NETA имел тенденцию к снижению, по сравнению с контрольной группой животных, уровень 5-Н1АА имел тренд к повышению после введение агониста только в гипоталамусе, однако данные измерения не достигали уровня статистической значимости. Также нами была выявлена тенденция к повышению уровней дофамина и его метаболитов DOPAC и HVA в гипоталамусе и стриатуме мышей экспериментальной группы, при этом соотношение DOPAC/DA в стриатуме было достоверно снижено в опытной группе ($p < 0,05$).

Выявленные изменения после введения α -NETA могут указывать на воздействие TAAR5 рецепторов на моноаминергические системы головного мозга. Однако, данные результаты являются предварительными и нами планируются дальнейшие исследования для прояснения роли TAAR5 в регуляции функций нервной системы.

Список литературы

Borowsky, Beth, Nika Adham, Kenneth A Jones, Rita Raddatz, Roman Artymyshyn, Kristine L Ogozalek, Margaret M Durkin, et al. 2001. "Trace Amines : Identification of a Family of Mammalian G Protein-Coupled Receptors."

Davis, Bruce A., and Alan A. Boulton. 1994. "The Trace Amines and Their Acidic Metabolites in Depression - an Overview." *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 18 (1): 17–45. doi:10.1016/0278-5846(94)90022-1.

Grandy, David K. 2007. "Trace Amine-Associated Receptor 1 – Family Archetype or Iconoclast?" *Pharmacol Ther.* 116 (3): 355–90. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.06.007.Trace.



Систематическая коррекция проблемы референсных минорных аллелей при аннотации и интерпретации вариантов.

Ю.А. Барбитов^{1,2,3}, И.В. Бездворных², А.С. Глотов¹, Е.А. Серебрякова¹ и
А.В. Предеус²

*1 – РЦ “Центр Биобанк” Научного Парка СПбГУ, Санкт-Петербургский
государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

2 – Институт Биоинформатики, Санкт-Петербург, Россия

*3 – Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный
университет, Санкт-Петербург, Россия*

e-mail: barbitoff@bk.ru

Референсная сборка генома человека, используемая практически во всех клинических исследованиях, содержит большое количество позиций, в которых референсная аллель является редкой и/или известной патогенной. В данных позициях интерпретация данных секвенирования нового поколения невозможна при использовании стандартных методологий анализа данных. Несмотря на то, что данная проблема была описана ранее, до сих пор не предложено методов простой и эффективной борьбы с ней. В этой работе мы сосредоточились на выявлении и коррекции всех негативных эффектов референсных минорных аллелей на определение и интерпретацию вариантов. В качестве референсных минорных аллелей (PMA) рассматривались варианты, имеющие частоту неререференсной аллели больше 0,5 в базах данных 1000 Genomes и Exome Aggregation Consortium (ExAC). Для аннотации эффекта референсных минорных аллелей замены были аннотированы при помощи программ SIFT, Polyphen2 и PROVEAN. В рамках работы было выявлено 12709 позиций в кодирующих последовательностях референсного генома, в которых референсная аллель является минорной, причем в 4952 случаях замена PMA на мажорную аллель приводила к замене аминокислоты. Мы обнаружили, что предсказания эффекта таких замен программами SIFT, PROVEAN и Polyphen2, предоставляемыми веб-серверами или базой dbNSFP, являют собой “обратные предсказания”, т.е. предсказания эффекта замены мутантной аминокислоты на аминокислоту дикого типа. Также мы выявили 11403 вариантов, функциональный эффект которых аннотируется неправильно ввиду наличия PMA в том же кодоне. Среди таких вариантов были обнаружены 1239 нонсенс-мутаций, мисаннотируемых как несинонимичные или синонимичные замены. Для исправления потенциальных ошибок, вызванных наличием PMA в геноме, была разработана интуитивно понятная программа “RMAHunter”, призванная предоставить правильную информацию обо всех PMA и соседствующих с ними вариантах в VCF-файле. С использованием результатов экзомного секвенирования 104 пациентов на базе РЦ “Биобанк” Научного Парка СПбГУ при помощи разработанной программы нами было оценено среднее количество



ложноположительных и ложноотрицательных PMA-ассоциированных вариантов в типичном экзоте пациентов. Мы обнаружили, что в среднем 15,4% редких несинонимичных вариантов являются ложноположительными результатами, а около 2 таких замен оказываются пропущены при стандартном анализе из-за наличия PMA. Таким образом, систематическая коррекция референсных минорных аллелей может улучшить точность интерпретации вариантов в клинической практике.

Работа по созданию биобанка поддержана грантом РФФИ №14-50-00069 и выполнена на базе РЦ «Биобанк» Научного Парка СПбГУ.



Перспективные материалы для создания нейрональных имплантов

Баршутина М.Н.¹, Горский О.В.^{1,2}, Мусиенко П.Е.^{1,2,3}

¹Лаборатория нейропротезов, Институт трансляционной биомедицины СПбГУ,
Санкт-Петербург, Россия;

²Лаборатория нейромоделирования, Российский Научный центр Радиологии и
Хирургических Технологий, Санкт-Петербург, Россия;

³Лаборатория нейрореабилитационных технологий, Клиника детской хирургии и
ортопедии, НИИФ МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

По мере миниатюризации медицинских электронных устройств, все большее значение приобретает разработка и получение новых материалов для их создания, которые способны работать с высокой эффективностью как на макро-, так и на микроуровне. Особенно большое внимание уделяется качеству стимулирующих и регистрирующих электродов нейрональных имплантов.

Традиционные металлы (Pt, Au, Pt-Ir), используемые для их получения, обладают рядом недостатков, которые проявляются все сильнее при переходе к микроразмерам. К таким недостаткам можно отнести большую механическую жесткость, высокое значение межфазного импеданса и низкие значения накопительной емкости заряда. Эти параметры оказывают непосредственное влияние как на эффективность, так и на безопасность работы импланта, поэтому являются определяющими при выборе материала для его создания.

В настоящее время к наиболее перспективным для получения электродов нейрональных имплантов можно отнести композиты на основе углеродных наноматериалов. Эти материалы имеют достаточно высокую проводимость, большое значение накопительной емкости заряда и низкую механическую жесткость, что оказывает непосредственное влияние на их биологическую совместимость с живыми тканями.

Нами была разработана технология получения композитов на основе многостенных углеродных нанотрубок (УНТ) и силикона, проведена оценка их механических, электрических и биологических свойств, а также созданы первые образцы нейрональных имплантов на их основе.

Как свидетельствуют полученные данные, оптимальными характеристиками для использования в качестве электродов нейрональных имплантов обладают композиты с концентрацией УНТ 10%. При этой концентрации композиты отличаются низким модулем упругости (5 МПа), сопоставимым с чистым силиконом (2 МПа), и достаточной проводимостью ($2 \cdot 10^{-4}$ См.см), позволяющей использовать их в качестве материала для регистрирующих электродов. Созданные образцы нейрональных имплантов на основе композитов УНТ-силикон показали достаточную эффективность в ходе *in vivo* исследований с использованием лабораторных животных.



Дальнейшие наши работы направлены на получение композитов на основе углеродных наноматериалов, проводимость которых находится в диапазоне $10^{-2} - 10^{-1}$ См/см, что позволит эффективно использовать их не только в качестве регистрирующих, но и стимулирующих электродов. С этой целью мы планируем разработку технологии получения композитов на основе одностенных нанотрубок, углеродных нановолокон, графена и проводящих полимеров.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-01822-а и грантом президента РФ МД 1018.2017.7.



Y-tools: пакет инструментов для задач иммуноинформатики.

Андрей Бзикадзе, Александр Шлемов, Сергей Банкевич,
Андрей Слабодкин, Тимофей Проданов, Яна Сафонова,
Павел Певзнер.

За последние несколько лет развитие технологий секвенирования позволило получать данные сканирования репертуаров адаптивных иммунных рецепторов: антител и Т-клеточных рецепторов. Такое развитие позволило сформулировать многие иммунологические задачи в виде вычислительных задач и сформировать новое направление биоинформатики: *иммуноинформатика*. Отправной задачей новой области *иммуноинформатики* является точное восстановление *репертуара иммунных рецепторов* из данных иммуносеквенирования.

Даже наиболее качественные данные иммуносеквенирования, полученные с помощью современных протоколов, подвержены высокому уровню ошибок. Таким образом, отделение естественного разнообразия иммунных рецепторов от ошибок пробоподготовки или задача построения репертуара является первоначальным шагом при переходе к дальнейшим иммунологическим задачам: изучению, например, динамики иммунного ответа, эволюционного развития антител, специфичности против различных антигенов, а также свойств функциональных репертуаров. Объем данных секвенирования, получаемых из одного запуска, из года в год значительно возрастает. Таким образом, разрабатываемые вычислительные инструменты должны быть точными и устойчивыми к ошибкам в рядах, но, в то же время, вычислительно эффективными. Иммуноинформатическая группа Центра Алгоритмической Биотехнологии СПбГУ разработала следующий пакет инструментов. IgReC — инструмент для восстановления репертуаров антител из ридов, полученных технологией Illumina MiSeq; BarcodedIgReC — модификация IgReC, которая при восстановлении репертуара позволяет учитывать информацию о *уникальных молекулярных идентификаторах* (UMI-баркодах); IgQUAST — инструмент для оценки качества восстановления репертуаров антител; IgDiversityAnalyzer — инструмент для анализа разнообразия репертуаров антител.

Помимо IgReC/BarcodedIgReC для решения тех же задач коллегами из других лабораторий были предложены пакеты pRESTO (лаборатория доктора Стивена Клинштейна, Йельский Университет, США) и MiTools (лаборатория геномики адаптивного иммунитета ИБХ РАН). Однако, при помощи подробного анализа (в том числе, с помощью IgQUAST/IgDiversityAnalyzer) было установлено, что IgReC и BarcodedIgReC качественно превосходят своих конкурентов и способны точно восстанавливать репертуары сложной клональной структуры с большим количеством естественных мутаций, несмотря на высокий уровень ошибок во входных чтениях.

Репертуар антител является результатом быстрой эволюции, которая реализуется посредством различных процессов *вторичной диверсификации антител*, включающих



соматический гипермутационез. В результате многократных циклов вторичной диверсификации, репертуар антител представляет собой набор *клональных линий* различного размера. Каждая линия может рассматриваться как *клональное дерево*. Построение клональных деревьев из данных секвенирования, полученных во время иммунного ответа, позволяет обнаруживать функциональные антитела — обычно наиболее представленное клональное дерево состоит из антител, специфичных к активному антигену. В связи с этим построение клональных деревьев из репертуара антител и анализ иммунных ответов широко используются в дизайне лекарственных средств и вакцин. Несмотря на существование множества подходов к задаче эволюционного анализа, имеющиеся филогенетические инструменты не могут быть напрямую применены к репертуарам антител. Основное различие между стандартной и иммунологической постановкой задачи состоит в наличии промежуточных клонов. Филогенетические алгоритмы предполагают, что все клоны отражены листьями деревьев, что неверно для репертуаров антител. В лаборатории ведется разработка AntEvolо — инструмента для построения клональных деревьев антител.



Ответы на ТМС во время наблюдения за движением как предиктор моторного обучения

Баневич Т.¹, Солодков Р.², Феурра М.², Благовещенский Е.^{2,3}

¹Сколковский Институт Науки и Технологий

²НИУ «Высшая Школа Экономики»

³Санкт-Петербургский Государственный Университет

30 лет назад были обнаружены зеркальные нейроны и системы зеркальных нейронов (СЗН). С момента их открытия было проведено много исследований с целью определения их точного местоположения, функции и эволюционной роли. Наиболее обсуждаемый вопрос заключается в том, связана ли деятельность СЗН с определенными задачами или является отражением побочных процессов в мозге.

В этой связи интересным представляется взаимосвязь СЗН и процессов обучения, поскольку обучение также является отражением внешнего воздействия на поведенческом уровне.

Целью данной работы была оценка возможности прогнозировать результаты сенсомоторного обучения, исходя из начального состояния первичной моторной коры (М1) в парадигме СЗН. Метод транскраниальной магнитной стимуляции (ТМС) использовался для отслеживания изменений возбудимости М1.

В исследовании приняли участие 13 испытуемых. Используя ТМС, «зеркальный эффект» измеряли путем записи вызванных моторных потенциалов (ВМП) из двух мышц для пяти различных условий, называемых «Пустой блок», «Наблюдение за неподвижной рукой», «Наблюдение за движением пальцев», «Наблюдение за нажатием кнопки», «Завершающий пустой блок». В качестве целевой мышцы использовали first dorsal interosseous (FDI), а в качестве контрольной мышцы - abductor digiti minimi (ADM) (т. е. мышцы не участвующей в наблюдаемых движениях). Зеркальный эффект оценивался как увеличение амплитуды ВМП при наблюдении за движением руки: движения пальцев и движение нажатия кнопки во время ТМС первого дня. Стимуляция осуществлялась с помощью навигационной ТМС одиночной стимуляции левого и правого полушария «горячей точке» для М1. Начиная со второго дня и в общей сложности четыре дня, испытуемые проходили двадцатиминутные тренировки обучения в задаче на время реакции. Повторная ТМС сессия проводилась на шестой день.

Достоверный эффект обучения был обнаружен у всех испытуемых. Также было обнаружено достоверное изменение в «зеркальной системе» после обучения в правом полушарии, по сравнению с левым. Предварительный анализ результатов показывает отсутствие корреляции между начальным состоянием моторных СЗН и уровнем успеха



в обучении сенсомоторному навыку. Результаты показывают, что предсказания успешности сенсомоторного обучения не могут быть сделаны. Однако, был обнаружен следующий феномен: результаты обучения моторному навыку коррелировали с уровнем СЗН записанному в последней ТМС сессии. Мы наблюдали увеличение эффекта СЗН на доминирующем полушарии М1, а также устойчивое снижение не доминирующего М1. Полученные результаты позволяют лучше понять роль СЗН в процессах обучения, не являясь, по сути.



Реконструкция структуры прионных агрегатов, сформированных *in vivo*.

Бондарев С.А.^{1,2}, Полещук О.И.¹, Журавлева Г.А.^{1,2}, Каява А.В.^{3,4,5}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, а также ²лаборатория биологии амилоидов, ³Университет ИТМО,

⁴Центр исследований биохимии макромолекул, CNRS, Университет Монпелье, Франция, ⁵Институт компьютерной биологии, Монпелье, Франция

e-mail: stanislavspbgu@gmail.com

Прионы были впервые охарактеризованы в связи с тяжелыми нейродегенеративными заболеваниями. Тем не менее сейчас активно накапливаются данные, свидетельствующие об их потенциальных физиологических функциях. Это способствует развитию интереса к исследованиям в этой области, где одним из нерешенных остается вопрос об определении структуры прионных агрегатов, которые в большинстве случаев представляют собой амилоиды. Современные биофизические методы не позволяют напрямую решить эту задачу. В такой ситуации выходом из положения является развитие подходов совмещающих экспериментальные данные с компьютерным моделированием.

Недавно нами была разработана программа «BetaSerpentine», которая способна моделировать возможные варианты укладки белка в составе амилоидных агрегатов. Для известных белков-прионов она предсказывает тысячи потенциальных β -серпантинов, что хорошо согласуется с известными данными о поливариантности их структуры. Сочетание этих данных с результатами мутационного анализа позволяет выделить конкретные структуры, которые объясняют эффекты соответствующих замен на свойства прионов. Если некая мутация приводит к потере приона, то можно предположить, что соответствующий белок не способен воспроизвести структуру предсуществующих агрегатов. Таким образом, из множества вариантов β -серпантинов, предсказанных для исходного белка, можно исключить те, которые может формировать и белок с анализируемой заменой. В том случае, если мутация никак не влияет на свойства приона, искомая структура, должна быть общей и для белка «дикого типа», и для его варианта с заменой. Используя этот подход нам удалось сделать предположения о структуре агрегатов Sup35 для разных вариантов приона [PSI^+], полученных в нашей лаборатории. В качестве набора мутаций мы использовали аллели, ранее сконструированные и охарактеризованные в нашей лаборатории. Все они приводят к заменам пары полярных аминокислот на заряженные в различных участках N-терминального домена Sup35, необходимого для его прионизации.

Работы выполнены при поддержке грантов СПбГУ (1.37.291.2015 и 15.61.2218.2013), грантов РФФИ (16-04-00202, 15-04-06650, 17-54-150002), а также ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.



***De novo* секвенирование белков по данным top-down масс-спектрометрии с фрагментацией методом ультрафиолетовой фотодиссоциации при длине волны 193 нм.**

Вяткина К. В.

*Лаборатория «Центр алгоритмической биотехнологии» ИТБМ СПбГУ
(по результатам совместной работы с Jared Shaw и Ljiljana Paša-Tolić, PNNL, USA)*

Ультрафиолетовая фотодиссоциация (УФФД; ultraviolet photodissociation, UVPD) зарекомендовала себя как эффективный метод активации ионов в биологической масс-спектрометрии. В частности, ее применение при масс-спектрометрическом анализе белковых молекул на основе подхода top-down позволяет получить почти полное покрытие аминокислотной последовательности исследуемого белка. Это означает, что информации, содержащейся в полученном таким образом тандемном (МС/МС) масс-спектре, потенциально может быть достаточно для решения задачи *de novo* секвенирования белка. В то же время, одновременное присутствие в УФФД-МС/МС-спектрах внушительного количества различных типов фрагментных ионов существенно затрудняет их интерпретацию и делает невозможным применение для этих целей существующих алгоритмов и программных инструментов, не учитывающих особенностей таких данных.

В данной работе предлагается первый алгоритм для *de novo* секвенирования белковых последовательностей по индивидуальным УФФД-МС/МС-спектрам. Входными данными для него является тандемный масс-спектр с нейтральными моноизотопными массами. На первом шаге выполняется поиск групп пиков, которые на основе разностей их масс могут быть интерпретированы как фрагментные ионы, соответствующие одному и тому же N- или C-концевому фрагменту последовательности белка. Далее, для каждой группы генерируются пики нулевой интенсивности с массами, соответствующими “недостающим” типам фрагментных ионов. После этого выполняется построение так называемого *обобщенного спектрального графа*, вершины которого соответствуют сформированным группа пиков, а ребра проводятся между парами вершин, для которых сопоставленные им пики одного и того же типа отстоят друг от друга на массу некоторой аминокислоты. Каждое ребро помечается обозначением соответствующей аминокислоты. Наконец, к полученному графу применяются вспомогательные алгоритмы поиска путей, позволяющие восстановить протяженные N- и C-концевой фрагменты белковой последовательности: соответствующие аминокислотные строки составляются из меток на ребрах, образующих найденные пути.

Эффективность предложенного подхода была проиллюстрирована на примере УФФД-МС/МС-спектра убиквитина для иона-предшественника с зарядом +10, полученного при длине волны $\lambda=193$ нм на модифицированном масс-спектрометре



Thermo Q-Exactive. В данном масс-спектре были представлены следующие девять типов фрагментных ионов: A, A+, B, C, X, X+, Y-, Y, Z. Его деконволюция была выполнена посредством алгоритма Xtract. Изложенный выше метод восстановил N- и C-концевой фрагменты последовательности убиквитина, покрывающие в общей сложности 66 из 76 (87%) составляющих ее аминокислот. Недостающий участок из десяти аминокислот был далее восстановлен с применением метода Twister [1] в сочетании с алгоритмом деконволюции MS-Deconv [2]. После того как были скомбинированы полученные результаты, итоговая аминокислотная последовательность имела вид:

**QIFVK[TL]TGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRT
LSDYNIQKESTLHLVLRRLGG**

и соответствовала последовательности убиквитина с точностью до I/L-замены. Для димера TL, образованного седьмой и восьмой аминокислотами, не удалось определить их порядок ввиду отсутствия в масс-спектре свидетельствующих о нем фрагментных ионов.

Список литературы

1. K. Vyatkina, S. Wu, L. J. M. Dekker, M. M. van Duijn, X. Liu, N. Tolić, M. Dvorkin, S. Alexandrova, T. M. Luidier, L. Paša-Tolić, P. A. Pevzner. De novo sequencing of peptides from top-down tandem mass spectra. *J. Proteome Res.* 2015, 14(11), 4450-4462.
2. X. Liu, Y. Inbar, P. C. Dorrestein, C. Wynne, N. Edwards, P. Souda, J. P. Whitelegge, V. Bafna, P. A. Pevzner. Deconvolution and database search of complex tandem mass spectra of intact proteins: a combinatorial approach. *Mol. Cell. Proteomics* 2010, 9(12), 2772-2782.



Идентификация новых лигандов рецепторов следовых аминов для фармакологических и молекулярно-биологических исследований.

Герасимов А.С.¹, Коренькова О.М.¹, Espinoza S.³, Гайнетдинов Р.Р.^{1,2}

1. *Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии института трансляционной биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия;*
2. *Сколковский институт науки и технологий, Московская область, Россия;*
3. *Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Genoa, Italy.*

Рецепторы следовых аминов (trace amines associated receptors, TAARs) представляют собой небольшую группу, относящуюся к рецепторам семейства GPCR. Естественными лигандами данных рецепторов являются такие соединения, как бета-фенилэтиламин, тирамин, октопамин, а также некоторые производные ароматических аминокислот (Liberles, 2015). Наиболее изученным представителем данной группы рецепторов является TAAR1. В многочисленных исследованиях показано, что он вовлечен в работу определенных молекулярных механизмов, ответственных за двигательные и когнитивные функции, а также эмоциональный контроль (Sotnikova et al, 2008, Thorn et al, 2014, Espinoza et al, 2015). Более того показана немаловажная роль TAAR1 рецептора в регуляции функций эндокринной и иммунной систем (Panas et al, 2012, Raab et al, 2015). Таким образом, TAAR1 является перспективной молекулярной мишенью для создания препаратов от нейропсихических заболеваний, таких как депрессия и шизофрения, а также сахарного диабета.

На сегодняшний день активно ведутся разработки синтетических лигандов рецептора TAAR1 человека (Galley et al, 2012, 2015, Stalder et al, 2011). Следовательно, поиск эффективной технологии скрининга синтетических соединений на предмет активации/ингибирования активности TAAR1 рецептора является актуальной задачей. Целью данной работы являлось проведение скрининга различных лекарственных субстанций на предмет активации TAAR1 рецептора человека и TAAR5 рецептора мыши. В качестве объектов исследования были выбраны следующие коммерческие библиотеки (суммарно порядка 1500 соединений): «SCREEN-WELL® FDA approved drug library V2», «SCREEN-WELL® Adrenergic ligand library», «SCREEN-WELL® Dopaminergic ligand library», «SCREEN-WELL® Serotonergic ligand library», «SCREEN-WELL® Opioid ligand library», «SCREEN-WELL® Cholinergic ligand library», «SCREEN-WELL® Histaminergic ligand library», «SCREEN-WELL® Ionotropic Glutamatergic ligand library», «SCREEN-WELL® Metabotropic Glutamatergic ligand library», «SCREEN-WELL® GABAergic ligand library», «SCREEN-WELL® Purinergic ligand library» (Enzo Life Science).

Изучение активности данных соединений в отношении исследуемых TAAR рецепторов проводилось по следующей методике BRET. Культуру клеток НЕК293Т выращивали на среде DMEM. Затем клетки котрансфецировали двумя



экспрессионными векторами: рсhTAAR1 (3 мкг) или рсмTAAR5 (8 мкг) и рсЕРАС (3 мкг) при помощи «липофектамина 2000» по стандартному протоколу. В качестве отрицательного контроля, для оценки неспецифического взаимодействия, вместо вектора с геном рецептора использовали «пустой» вектор рсDNA3.1(+) в таком же количестве. После проведения клетки снимали с чашки, суспендировали в среде MEM и переносили в 96-ти луночный планшет из расчета 100000 – 150000 клеток на лунку. Выращивали на планшетах в течение 36 – 48 часов. Затем культуральную жидкость осторожно удаляли при помощи аспиратора, и в каждую лунку последовательно добавляли 70 мкл PBS буфера, 10 мкл 2мМ раствора IBMX и 10 мкл 50 мкМ раствора коэлектрантина h. Планшет инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем для определения эффективной концентрации (EC_{50}) добавляли растворы лигандов в разведениях от 1 пМ до 10 мкМ и инкубировали еще 5 минут при комнатной температуре. Все соединения тестировали в 3 повторах. Далее планшет помещали в ридер, и в течение 20 минут считывали значения интенсивности люминесценции с максимумами при длинах волн 535 и 480 нм. Затем математически вычисляли BRET ratio, строили кривые зависимости «доза-эффект» и определяли эффективную концентрацию лиганда.

В результате проведенных экспериментов были определено несколько агонистов TAAR1 рецептора и всего лишь 1 агонист TAAR5 рецептора. Для TAAR1 рецептора были найдены уникальные соединения имидазолиновой природы с эффективной концентрацией в пиколярном и субнанолярном диапазоне. Все они являются агонистами альфа2-адренергического рецептора, что, несомненно, вызывает интерес к функциональной селективности данных соединений и их терапевтических эффектам.



Биобанк. Возможности. Проекты. Перспективы.

Глотов А.С., Насыхова Ю.А., Полев Д.Е., Чекунова Е.М., Серебрякова Е.А., Шувалова А.Р., Михайлова А.А., Золотарева А.Д., Илларионов Р.Р., Вашукова Е.С., Барбитов Ю.А., Предеус А.В., Пакин В.С., Баранов В.С., Чернов Ю.О., Сарана А.М., Щербак С.Г., Глотов О.С.

ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

ФГНБУ «НИИАГиР им.Д.О.Отта», Санкт-Петербург, Россия

ГБ СПб ГБУЗ «Городская больница №40», Санкт-Петербург, Россия

Институт биоинформатики, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: a.glotov@spbu.ru

После триумфальной расшифровки генома человека дальнейшее развитие подходов к анализу индивидуальных биологических особенностей и факторов риска требует развития таких направлений, как индивидуальная и популяционная геномика, транскриптомика, и протеомика. Совокупность этих подходов позволяет перейти к генетической паспортизации и персонализированной медицине. Критическим элементом для такого исследования является наличие большой выборки индивидуальных проб документированного происхождения, доступных для молекулярно-генетического и биохимического анализа высокой разрешающей способности. Базу для этого создают национальные биобанки.

Нами при сотрудничестве СПбГУ, СПб ГБУЗ «Городская больница №40» и НИИ «АГиР им.Д.О.Отта» и других организаций стартовал систематизированный сбор биообразцов. В соответствии с требованиями ISBer and VBMRI сегодня собрано материала от 1824 пациентов в общем количестве 13153 образца. Планируется к 2019 году иметь более 100 000 образцов.

Несмотря на сбор биообразцов, уже сегодня на базе Биобанка реализуется ряд важных генетических проектов. Одним из таких проектов, является проект «Российские Геномы». Проведено исследование 61 генома россиян и 6-ти контрольных образцов с использованием современного секвенатора HiSeq 4000.

Другим примером реализации возможностей биобанка является проект по исследованию экзомов. Для исследования спектра мутаций был разработан уникальный биоинформатический алгоритм обработки данных (<http://genome.ifmo.ru/snvviewer>). Используя данный алгоритм, было проведено экзомное секвенирование образцов ДНК более 220 пациентов. Используя данный алгоритм, нам удалось существенно увеличить чувствительность NGS теста для некоторых наследственных заболеваний. Данный подход используется для составления практических рекомендаций пациентам. В рамках Научного парка создана база



данных, содержащая информацию о мутациях при таких комплексных заболеваниях как СД2 типа, диабет МОДИ, ожирение (<https://biobank.ga>).

Третьим примером использования ресурсов Биобанка является проект «Реконструкция этногенеза населения Северо-Запада России, начиная с эпохи неолита, методами этногеномики, палеогенетики и археологии» в сотрудничестве с Государственными Эрмитажем. Цель проекта состоит в изучении динамики структуры генофонда населения Северо-Запада России в контексте исторических и природных процессов. С использованием секвенатора HiSeq 2500 проведены первые исследования.

Мы полагаем, что создание банков биообразцов, уникальных баз данных генных мутаций, отечественных референсных последовательностей, новых биоинформатических протоколов является необходимым элементом развития персонализированной медицины будущего.

Работа по созданию биобанка поддержана грантом РФФИ №14-50-00069, исследования выполнены на базе РЦ «Центр Биобанк» Научного парка СПбГУ.



Энергообеспечение имплантируемых средств нейропротезирования

Горский О.В.^{1,2,3}, Килимник В.А.³, Мусиенко П.Е.^{1,2,3}

¹Лаборатория нейропротезов, Санкт-Петербургский государственный университет;

²Лаборатория нейромоделирования, Российский научный центр радиологии и хирургических технологий;

³Отдел биотехнических проблем, Государственный университет аэрокосмического приборостроения.

Достижения электрофизиологических, фармакологических, оптогенетических подходов замещения и восстановления функций нервной системы должны планомерно внедряться в клиническую практику. Одной из важнейших задач по трансляции разработанных технологий является создание имплантируемых устройств (ИУ), обеспечивающих высокую специфичность воздействия. Миниатюрность ИУ и уровень их энергопотребления неотъемлемо связаны со сроком службы подсистемы питания. В ходе проведенного нами системного анализа современной литературы были рассмотрены четыре подхода к реализации питания ИУ: (1) непerezаряжаемые химические источники (батареи); (2) беспроводная передача энергии (БПЭ; индуктивный, ёмкостной, микроволновый, инфракрасный и ультразвуковой принципы); (3) преобразование энергии специфических источников биологического объекта (ПЭСИ; биотопливные ячейки, преобразование кинетической, термоэлектрической энергии, энергии видимого и инфракрасного спектрального диапазонов); (4) изотопные источники. Им соответствовали следующие значения энергоёмкости: батареи (Li/I₂, Li/Ag₂V₄O₁₁) - 200...300 Вт·ч/кг (600...800 мВт·ч/см³), БПЭ - 0,1...100 мВт/см², ПЭСИ - 0,0001...0,1 мВт/см², изотопные ИП - до 0,0001 мВт/см². Поскольку прогнозируемый диапазон значений потребляемой мощности для средств нейропротезирования находится в пределах 1...100 мВт, нами был сделан вывод, что единственным приемлемым подходом является БПЭ, а именно ультразвуковой, либо индуктивный способ. Для дальнейшей работы был выбран индуктивный способ БПЭ ввиду его меньшего удельного веса и меньшей сложности реализации.

Работа, посвящённая проблемам аппаратного исполнения индуктивного способа БПЭ, включала в себя выполнение требований стандарта безопасности ISO 14708-1:2014, IEEE Std C95.1, ограничивающих нагрев тканей в пределах 2 °С и упреждающих эффект стимуляции тканей под действием электромагнитного поля. Компьютерный расчёт величины SAR (удельный коэффициент поглощения тканями энергии ЭМП) показал значения на два порядка меньше предельно допустимого уровня 0,4 Вт/кг при обеспечении зарядного тока 50 мА в фантоме мышцы при частоте ЭМП 880 кГц. Исследование структуры систем подобного класса позволило выявить основные параметры, влияние которых на суммарный нагрев требовало однозначной



оптимизации: активное частотно-зависимое сопротивление приемного индуктора, спектр сигнала на резонансном конденсаторе, сопротивление цепи заряда аккумулятора. Также были разработаны обязательные к внедрению подходы автоматической подстройки мощности генератора ЭМП, учитывающие взаимное положение генератора и ИУ. Имитационные и натурные испытания осуществлялись в тканеэквивалентных средах и в ходе пилотных экспериментов на кошке при помощи разработанного коллективом телеметрического ИУ. Максимальный прирост температуры тканей относительно температуры окружающей среды находился в пределах 1,1...1,5 °С (абсолютное значение температуры тканей не превышало 35,3 °С) при глубине имплантации 20 мм в мышечном слое лопаточной области и заряде элемента питания током 50 мА в течение 2,5 часов.

Проведенная работа подтвердила эффективность выбранного подхода БПЭ энергообеспечения ИУ, выявила необходимость оптимизации аппаратной схемы индуктивной зарядки и дальнейших исследований комплексного влияния ИУ на биологический объект.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-01822-а и грантом президента РФ МД 1018.2017.7.



Реконструкция индивидуальных геномов из метагеномных рядов.

Горшков Юрий

Центр алгоритмической биотехнологии, СПбГУ

Многие современные метагеномные исследования (например, воды, почвы или кишечной микрофлоры) включают анализ целого ряда похожих образцов, представляющего временной (если забор образцов происходил из одного источника в разные моменты времени) или пространственный (взятие происходило из близкорасположенных источников) ряд. Анализ такого рода данных, в частности, проливает свет на динамику изменений бактериального сообщества и связи между его функциональными и геномными характеристиками. Будучи зачастую «побочным продуктом» подобных исследований, данные полногеномного секвенирования метагеномных рядов предоставляют беспрецедентные возможности по повышению качества реконструкции геномов индивидуальных организмов, входящих в бактериальное сообщество. Отправной точкой является наблюдение, что глубина покрытия геномных фрагментов одного организма при рассмотрении различных образцов изменяется синхронно. Это позволяет эффективно использовать т. н. «профили» (векторы покрытия геномного фрагмента в каждом образце), чтобы изолировать фрагменты, принадлежащие определённому организму, из всего множества, реконструированного в процессе метагеномной сборки.

Начиная с 2013 года было опубликовано множество работ, основанных на данной идее. Наиболее популярные на данный момент методы развивали её применительно к решению задачи *биннинга контигов* – разбиения предварительно собранных геномных фрагментов на множества, соответствующие отдельным организмам. К сожалению, реализованные на данный момент подходы обладают рядом существенных недостатков, в частности:

- Отправной точкой для работы большинства протоколов является *ко-сборка* всех имеющихся образцов, которая зачастую является вычислительно трудной или неосуществимой, а также приводит к падению качества сборки.
- Остальные протоколы используют ненадёжные и/или субоптимальные методы интеграции результатов индивидуальных сборок.
- Существующие протоколы в лучшем случае включают самый поверхностный анализ близкородственных бактериальных штаммов. В худшем случае, присутствие таковых ведёт к значительному падению качества реконструкции генома бактериального вида.

С начала 2016 года в лаборатории "Центр алгоритмической биотехнологии" ведётся разработка нового вычислительного протокола MTS (*Metagenomic Time Series*), призванного решить эти и другие проблемы существующих подходов. Сборка



метагеномного ряда при помощи MTS – полностью автоматизированный процесс, состоящий из следующих шагов:

1. Вычисление кратности коротких k-меров ($k=21$) во всех имеющихся образцах, что позволяет впоследствии быстро вычислять приближённое значение глубины покрытия произвольных геномных фрагментов;
2. Сборка индивидуальных образцов сборщиком metaSPAdes, также разрабатываемым в нашей лаборатории;
3. Вычисление профилей покрытия для контигов из профилей, содержащихся в них k-меров;
4. Предварительная кластеризация фрагментов на основе их профилей с использованием алгоритма Canopy (*Nielsen et al., 2014*);
5. Уточнение результатов кластеризации с использованием сохранённого на стадии сборки графа де Брюйна, который является «внутренней кухней» metaSPAdes;
6. Идентификация парных чтений, соответствующих отдельным кластерам, во всех имеющихся образцах;
7. Пересборка отдельных кластеров с помощью модифицированной версии алгоритма metaSPAdes, которая комбинирует отобранные прочтения из нескольких образцов и использует покрытие кластера для фильтрации шумов. Данный этап является ещё одной уникальной особенностью нашего протокола.

Помимо этого, ведётся работа по интеграции профилей рёбер графа на стадии пересборки для декомпозиции близкородственных геномов.

MTS разработан на основе биоинформатического фреймворка Snakemake и имеет легко модифицируемую модульную структуру, позволяющую использовать альтернативные инструменты на шагах 1–4. В частности, эта возможность активно используется при сравнении MTS с конкурирующими подходами на синтетических и реальных наборах данных.



Динамика образования и морфология агрегатов, сформированных прионогенными белками в дрожжах.

А.В. Гризель¹, А.А. Рубель¹ и Ю.О. Чернов^{1,2}

¹Научная лаборатория биологии амилоидов и Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

²Факультет биологических наук, Технологический институт Джорджии, Атланта, США.

Фибриллярные белковые полимеры с кросс-бета структурой (амилоиды) и их инфекционная форма (прионы) являются причиной неизлечимых болезней млекопитающих и контролируют некоторые фенотипические признаки у дрожжей. Механизм образования амилоидов *in vivo* до конца не ясен. Прионная изоформа дрожжевого белка Sup35 - $[PSI^+]$ образуется путем сверхпродукции прионовых доменов белка Sup35 (Sup35NM). Этот процесс происходит эффективно либо в присутствии другого белка в прионной форме (например, белка Rnq1, $[PIN^+]$), или когда Sup35NM присоединен к другому амилоидогенному белку, например амилоиду бета (Abeta), который ассоциирован с болезнью Альцгеймера. Сверхпродукция прионных доменов Sup35 в присутствии приона $[PIN^+]$ приводит к образованию разнообразных типов агрегатов, в том числе филаментов, колокализующихся с актиновым цитоскелетом и представляющие собой промежуточную форму формирования приона $[PSI^+]$. Мы изучили, могут ли химерные конструкции с пептидом Abeta (Sup35NM-Abeta) формировать филаменты.

Формирование агрегатов изучалось методом флуоресцентной микроскопии. Для этого использовалось два подхода: (1) к химерному белку, состоящему из прионных доменов Sup35 с пришитым Abeta был присоединен флуоресцентный белок CFP (Sup35NM-Abeta-CFP); (2) Химерный белок Sup35NM-Abeta коэкспрессировался с белком, состоящим из Sup35NM слитым с YFP. При образовании агрегатов химерным белком Sup35NM-Abeta в них включались белки Sup35NM-YFP, что позволяло визуализировать агрегаты с помощью флуоресцентной микроскопии. В обоих случаях конструкции экспрессировались в клетках дрожжей *S. cerevisiae*.

В результате работы было показано, что химерный белок Sup35NM-Abeta-YFP очень эффективно образует гранулярные агрегаты и не образует филаментов, при этом такой белок не индуцирует прион $[PSI^+]$. В то же время химерный белок Sup35NM-Abeta продуцируемый совместно с Sup35NM-YFP может образовывать филаменты наряду с гранулярными агрегатами и может эффективно переходить в прионное состояние.

Наши данные показывают, что присоединение к С-концу Abeta (в составе химеры Sup35NM-Abeta) флуоресцентного белка нарушает его способность к образованию



приона Sup35. Процесс индукции приона белка Sup35 путем сверхпродукции химерной конструкции Sup35NM-Abeta сходен с процессом индукции приона [PSI^+] в присутствии приона [PIN^+].

Работа выполнена при поддержке грантов РФФ № 14-50-00069, РФФИ №15-04-08159 и №15-04-06650, «Династия» и гранта СПбГУ 1.50.1038.2014. Для выполнения исследований использовалась приборная база ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС», «МиКТ» и «Центр Биобанк» научного парка СПбГУ.



Поиск новых амилоидогенных белков человека.

Зелинский А.А.¹, Романова Н.В.¹, Рубель А.А.¹, Каява А.В.³, Чернов Ю.О.^{1,2}

1. Санкт-Петербургский государственный университет, Россия
2. Технологический институт Джорджии, США
3. Университет Монпелье, Франция

Амилоиды – это белковые склонные к самосборке агрегаты фибриллярной природы, для которых характерно формирование межмолекулярных кросс-бета структур. Амилоиды известны в первую очередь тем, что вовлечены в развитие более 50-ти заболеваний человека и животных, в числе которых болезни Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона, диабет II типа, прионные заболевания. Наряду с патогенными амилоидными белками, в последние годы появляется всё больше данных о «функциональных» амилоидах, которые выполняют важные биологические функции, такие как регуляция долговременной памяти у животных, участие в полимеризации меланина у млекопитающих, хранение пептидных гормонов, формирование биоплёнок у бактерий и прочие.

Нами была разработана и апробирована дрожжевая тест-система, которая позволяет проверять амилоидогенный потенциал различных белков или их амилоидогенных доменов, в том числе проводить масштабные скрининги различных библиотек кДНК. Используя дрожжевую модель, мы проверили амилоидогенность нескольких потенциально амилоидогенных белков предсказанных ранее *in silico* при помощи алгоритма ArchCandy. Мы показали, что амилоидогенным потенциалом обладают изоформы 5 и 6 белка PNC3, входящего в комплекс PRC1. Функцией PRC1 является моноубиквитинирование лизина 119 гистона H2A. Взаимодействие PRC1 с ещё одним ремоделирующим комплексом PRC2, приводит к компактизации хроматина и, как следствие, ингибированию транскрипции. Мы предполагаем, что формирование амилоидов белком PNC3 может влиять на активность комплекса PRC1, регулируя, таким образом, транскрипционную активность целого ряда генов.

В данный момент проводится анализ других белков, амилоидогенность которых была предсказана биоинформатически.

Данные, полученные с использованием разработанной нами тест-системы, в совокупности с использованием биоинформатического метода, представляют новую стратегию в выявлении биологически важных амилоидогенных белков в протеоме человека.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-50-00069 и РФФИ № 15-04-08159, №15-04-06650. Для выполнения исследований использовалась приборная база ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС» и «РМиКТ» научного парка СПбГУ.



Простая модель оксидативного сворачивания пептидов и белков в молекулярной динамике.

С.А.Измайлов, И.С.Подкорытов, Н.Р.Скрынников

Лаборатория био-ЯМР СПбГУ, Санкт-Петербург 199034

В последние годы были достигнуты значительные успехи в отношении сворачивания пептидов и небольших белков *in silico* методами молекулярной динамики. Однако процедуры сворачивания белка в молекулярной динамике не включают в себя процесс образования дисульфидных связей. Для решения этой проблемы нами был разработан простой эмпирический протокол формирования дисульфидов в МД без возмущения системы и без потерь в скорости вычислений. Новый протокол был апробирован на небольшом пептиде гуанилине, состоящим из 15 аминокислотных остатков, в том числе четырех цистеинов. Общая длина траекторий МД в силовом поле Amber14SB составила 61 мкс. Получившееся распределение по изомерам находится в качественном согласии с экспериментом, что дает основания полагать, что окислительный стресс *in vitro* проходит под кинетическим контролем. Была получена высокостабильная конформация изомера 2(B), заметно отличающаяся от слабо упорядоченной структуры усечённого пептида PDB ID 1GNB. Кроме того было предпринято моделирование свёртывания гуанилина в составе прогоромона прогуанилина (94 аминокислотных остатка). Рассчитанная структура находится в хорошем согласии с координатами, полученными методом ЯМР (PDB ID 108R). Предлагаемая модель может оказаться полезной при исследовании некоторых фундаментальных аспектов свёртывания белков, а также при решении задач, связанные с изготовлением синтетических пептидов и рекомбинантных белков. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (проект №15-14-20038).



Бета-амилоидный пептид (A β) в сосудах после экспериментального тромбоза.

Кучерявых Л. (1), Вольнова А.(2), Зуева Л.(1) , А. В. Вашингтон (1), П. Санабриа(1), Инюшин М.(1).

(1) Школа Медицины, Центральный карибский университет, Байямон, США

(2) Биологический факультет, СПбГУ, С.-Петербург, Россия

Введение: Предполагается, что A β является важной частью древней системы защиты организма, участвуя в уничтожении бактериальных патогенов с помощью разнообразных механизмов, один из которых – образование больших катионных каналов в их мембранах. Показано, что тромбоциты содержат достаточно много протеина-предшественника A β (APP), который выделяется при активации тромбоцитов и превращается в A β -пептид с помощью катепсина Б. Во время коагуляции крови в сосудах тромбоциты активируются, это их основная функция. **Методы:** Мы применили флуоресценцию *in vivo* и электронную микроскопию, чтобы определить насколько тромбоциты концентрируются в сгустках в сосудах. Мы использовали иммуно-флуоресценцию, чтобы визуализировать A β после фототромбоза (инъекции Rose Bengal) в мозге и коже мыши. **Результаты:** Было показано, что тромбоциты концентрируются в 300–500 раз выше по сравнению с контролем. В мозге мышей после тромбоза иммунофлуоресценция A β была представлена внутри сосудов в зрительной коре, а также вокруг сосудов в энторинальной (entorhinal) коре, но не регистрировалась при индуцированной тромбоцитопении. При экспериментальном тромбозе в коже A β также концентрировался внутри и около кровеносных сосудов. **Выводы:** Тромбоциты обеспечивают генерацию A β при коагуляции. Высокая концентрация тромбоцитов позволяет увеличить количество A β , вырабатываемого во время тромбоза, что может быть дополнительным источником A β в мозге при болезни Альцгеймера, если у таких пациентов активируются тромбоциты. Эти данные также могут быть интерпретированы в терминах действия A β как элемента системы защиты от инфекции.



Организация вивария СПбГУ

Иоффе В.С., Ефимова Е.В.

Санкт-Петербургский Государственный Университет

В биомедицинских исследованиях крайне важен объект, на котором проводится научная работа. Одной из приоритетных задач при создании Института Трансляционной биомедицины была организация работы вивария, соответствующего международным стандартам.

В виварии была организована «чистая» зона, для содержания колонии животных. В комнатах содержания создана система вентиляции с HEPA-фильтрами и с поддержанием постоянной температуры, влажности воздуха, а также регулируемым световым циклом день/ночь (12/12 часов).

Животные содержатся в клетках с индивидуальной вентиляцией. Данные системы были закуплены в рамках реализации проекта «Трансляционная биомедицина в СПбГУ». Система индивидуальной вентиляции обеспечивает необходимую кратность воздухообмена непосредственно в клетках содержания животных и HEPA-фильтрацию. Для мойки клеточного оборудования в виварии используется промышленная моечная машина. Все материалы, попадающие в зону содержания животных, проходят автоклавирование. Таким образом, создаются оптимальные условия для содержания животных и минимизации риска их заболевания.

Виварий предназначен для содержания грызунов - крыс и мышей. Крысы и мыши содержатся в отдельных помещениях. В настоящее время нам удалось создать колонии нескольких линий трансгенных крыс и мышей.

Также в виварии организована зона для проведения экспериментов. Оборудовано две операционных комнаты. В каждую была проведена система подачи кислорода и углекислого газа. Для проведения операций в обеих операционных комнатах установлены системы ингаляционного изофлюранового наркоза. Также имеется система искусственной вентиляции легких и подогрева животных во время операций. Для проведения операций на мозге в виварии установлен стереотаксис.

Для проведения поведенческих экспериментов в виварии установлена система видеотрекинга Ethovision и оборудование для проведения тестирования - открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, тест Порсольта, Т-образный лабиринт, как для мышей, так и для крыс. Также установлена многофункциональная операционная камера от компании TSE.

Имеющееся в виварии оборудование позволяет проводить комплексную оценку состояния животных и может быть использовано для реализации многих экспериментальных задач.



**Прямое репрограммирование первичной нейрональной культуры,
выделенной из гиппокампа и коры головных полушарий
новорожденных мышей.**

Католикова Н.В., Гайнетдинов Р.Р.

Сколковский Институт Науки и Технологий, Москва, Россия

Институт Трансляционной Биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Болезнь Паркинсона (Parkinson's disease (PD)) – это нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга. Болезнью Паркинсона страдает более 2% людей старше 60 лет, но, несмотря на свое широкое распространение, PD на данный момент не имеет патогенетического лечения.

Одним из наиболее быстро развивающихся и перспективных направлений в лечении и PD является клеточная заместительная терапия. Для этих целей уже были использованы клетки, полученные из эмбриональных структур головного мозга, и нейроны и нейронные предшественники, полученные за счет дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток. И на данный момент можно утверждать, что экзогенные нейроны выживают при трансплантации в головной мозг, могут интегрироваться в существующие нейрональные сети и могут продуцировать нейротрансмиттеры.

Прямое перепрограммирование клеток является одним из новых методов получения нейронов. Было показано, что за счет активации групп транскрипционных факторов или за счет активации только одного фактора из различных типов клеток (фибробластов, астроцитов, перицитов) могут быть получены нейроны и нейрональные предшественники. Комбинации факторов, которые используются для создания дофаминергических нейронов, всегда содержат фактор *Ascl1* и от 2 до 4 дополнительных факторов. Считается, что *Ascl1* играет решающую роль в инициации процесса трансдифференцировки. В эмбриогенезе этот фактор является одним из ранних факторов дифференцировки дофаминергических нейронов, но также является ранним фактором дифференцировки ГАМКергических нейронов, которые идут от латерального ганглиозного возвышения (lateral ganglionic eminence (LGE)). Другими факторами, которые необходимы для перепрограммирования для получения дофаминергических нейронов, являются *PitX3*, *Lmx1a*, *Lmx1b*, *Nurr1*, *Brn2*, *Myt1l*, и но они важны для окончательной спецификации и созревания полученных нейрональных клеток.

В нашей работе мы получили полицистронные лентивирусные частицы, несущие три фактора *Ascl1*, *Lmx1b* и *Nurr1*. Мы показали, что эта система эффективна для прямого перепрограммирования эмбриональных фибробластов мыши в дофаминергические нейроны. Мы использовали эту систему для первичных



нейрональных культур, полученных из коры и гиппокампа новорожденных мышей. И мы обнаружили, что активация трех транскрипционных факторов *Ascl1*, *Lmx1b* и *Nurr1* в первичных культурах нейронов не вызывает значительного увеличения числа нейронов, экспрессирующих TH и DAT, и тип клеток, полученных в результате, зависит от того, откуда культура первоначально была получена.

Наши результаты находятся во взаимосвязи с ранее описанным фактом о судьбе астроцитов во время перепрограммирования, которые были выделены из разных областей мозга. Мы планируем продолжить нашу работу и проверить различные комбинации факторов, которые будут эффективны для перепрограммирования смешанной культуры.



Изучение взаимодействия амилоидов млекопитающих в дрожжах

Saccharomyces cerevisiae.

Качкин Д.В.¹, Чернов Ю.О.^{1,2}, Рубель А.А.¹

4. *Санкт-Петербургский государственный университет, Россия*

5. *Технологический институт Джорджии, США*

Амилоиды представляют собой высокоупорядоченные белковые агрегаты фибриллярной природы, имеющие кросс-β-структуру и способные катализировать присоединение к себе мономерных молекул того же белка с изменением их нормальной конформации. Особый интерес к амилоидам связан с тем, что они ассоциированы с развитием более чем 50-ти неизлечимых амилоидных заболеваний млекопитающих (амилоидозов).

Данная работа направлена на исследование возможности физического взаимодействия гетерологичных амилоидных белков млекопитающих, ассоциированных с развитием наиболее социально-значимых амилоидозов на дрожжевой модели, зарекомендовавшей себя в ходе предыдущих наших исследований. Анализ взаимодействия амилоидогенных белков проводили с помощью методов конфокальной микроскопии. В ходе данной работы были проанализированы амилоидные свойства белков человека (IAPP и Tau), слитых с флуорофорами. Установлено, что белок IAPP-YFP формирует видимые под микроскопом флуоресцентные агрегаты, устойчивые к действию детергента (3% саркозина). На основании полученных результатов сделано заключение о том, что репортерная последовательность YFP не препятствует агрегации IAPP. Белок IAPP проявляет свойства амилоидов в дрожжевой модели. Методами конфокальной микроскопии проанализирована возможность взаимодействия агрегатов белка PrP и пептида Aβ с белком IAPP. Установлено, что агрегаты PrP колокализуются с белком IAPP примерно в 55% клеток при этом физически не взаимодействуют. Пептид Aβ эффективно колокализуется и физически взаимодействует с белком IAPP-YFP. Таким образом, впервые получены данные о том, что пептид Aβ может специфично взаимодействовать с белком IAPP в клетках дрожжей.

Взаимодействие пептида Aβ с белком IAPP может объяснять частое сочетание таких заболеваний как диабет II-типа и болезнь Альцгеймера, и дают основание сделать предположение о влиянии этого взаимодействия на развитие и патогенез данных заболеваний.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-50-00069 и РФФИ № 15-04-08159. Для выполнения исследований использовалась приборная база ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС» и «РМиКТ» научного парка СПбГУ.



Текущие задачи химической фармакологии в ИТБМ СПбГУ

Красавин М.Ю.

Институт химии, Институт трансляционной биомедицины СПбГУ

m.krasavin@spbu.ru

В настоящее время коллектив лаборатории в СПбГУ насчитывает более 20 человек (<http://krasavin-group.org/group/index.shtml>). Инвестируя примерно 50% наших усилий в исследования фундаментального характера в синтетической органической химии, мы тем не менее беремся синтезировать только те соединения, фармакологический эффект для которых тем или иным образом предсказан. Таким образом, с самого начала исследованиям придается трансляционный фокус, чтобы далее можно было подключить медицинскую химию, оптимизировать наши находки и представить их в виде потенциального лекарственного средства. Можно сказать, что наша задача состоит в генерации и воплощении элементов химического пространства и успешном проецировании их на пространство известных биологических мишеней. В результате часто это приводит к тому, что выстраивая связь между новой химией и конкретными биомишенями, мы оказываемся в совершенно разных терапевтических областях.

В докладе будет отражено текущее состояние проектов, результаты которых были опубликованы за последние 12 месяцев, - либо проектов, находящихся на продвинутой стадии:

- современные принципы дизайна химических веществ, предназначенных для биомедицинских исследований (lead-like, high-Fsp3, medium-sized rings);
- трансляционное развитие ингибиторов карбоангидразы в области глаукомы;
- новое в дизайне «нежирных» активаторов рецептора жирных кислот GPR40;
- новый хемотип для дизайна антимикобактериальных соединений для лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью;
- агонисты рецептора TAAR1;
- поиск индукторов апоптоза, действующих по механизму блокировки белок-белкового взаимодействия p53-MDM2.

Публикации по основным направлениям исследований лаборатории представлены на сайте лаборатории (<http://krasavin-group.org/publications.shtml>) и ИТБМ (http://biomedinstitute.spbu.ru/en/publications_en).



Распознавание формы и пространственного расположения объектов у крыс линии Wistar.

Курзина Н.П., Вольнова А.Б.

Биологический факультет СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия

e-mail: a.volnova@spbu.ru

Для изучения особенностей формирования поведенческих навыков у лабораторных животных использование батареи различных тестов позволяет оценить динамику обучения и выявить те задачи, которые животные способны быстро усвоить и выполнять на достоверно высоком уровне. В серии экспериментов исследовали способность крыс к запоминанию формы объектов и их взаимного расположения в пространстве. Для этого использовали тест «Red Box» (Kesner R.P. & Ragozzino M.E., 2003), представляющий собой ящик из красного оргстекла, на дне которого расположены лунки, в которые помещали пищевое подкрепление, сверху лунок размещали предъявляемые объекты.

В экспериментах было использовано 20 крыс самцов линии Вистар массой 150-180г. Животные перед опытами подвергались пищевой депривации (75% обычного дневного рациона в течение трех дней). В качестве пищевого подкрепления использовали сухие завтраки Nestle (по 1/4 колечка в каждую лунку). Эксперименты проводили в интервале от 13.00 до 17.00 ежедневно в течение 4-6 дней.

В первой серии экспериментов животным предъявляли два одинаковых объекта («кубики»), расположенных симметрично с правой и левой сторон экспериментальной камеры. Задача состояла в обучении крыс сдвигать кубики и получать пищевое подкрепление. Практически все крысы смогли с первого дня обучения усвоить данный поведенческий навык и демонстрировали стабильность выполнения задачи в течение четырех экспериментальных дней.

Во второй серии экспериментов животным предъявляли два различных объекта одинакового цвета и веса, но различной формы («кубик» и «пешка»). Объекты также предъявляли с правой и левой сторон экспериментальной камеры, меняя местами в псевдослучайном порядке. Животное получало пищевое подкрепление после сдвигания кубика, при сдвигании пешки пищевое подкрепление отсутствовало, и этот выбор рассматривался как ошибочный. Оказалось, что усвоить данный навык и выполнять его на уровне, близком к 100% правильных реакций, могли все животные ко второму дню обучения, стабильность выполнения задачи сохранялась в течение четырех дней обучения.

В третьей серии экспериментов животным предъявлялись два одинаковых объекта («кубики»), однако менялось их взаимное расположение. Под кубиками, находящимися на дальней линии по отношению к стартовому отсеку, подкрепление присутствовало; в случае, если один из кубиков размещался ближе к животному,



подкрепление отсутствовало. Смена парадигмы предъявления производилась в псевдослучайном порядке. В этом эксперименте 50% уровень ошибочных реакций отмечался до 4-го дня обучения, а 100% уровень правильных реакций не был достигнут и к шестому экспериментальному дню.

Полученные данные свидетельствуют о том, что формирование ассоциаций «форма объекта – пищевое подкрепление» при предъявлении двух одинаковых подкрепляемых объектов, как и в случае использования объектов разной формы, один из которых подкреплялся, обучение происходит у крыс достаточно быстро. В то же время, при предъявлении пары объектов с различным взаимным расположением ассоциация «взаимное расположение объектов – пищевое подкрепление» формируется у лабораторных крыс значительно позже, не ранее 5-го дня обучения.

Можно полагать, что для решения первых двух задач крысы используют, главным образом, аппарат вибрисс и зрительную информацию. При выполнении третьей задачи, вероятно, происходит формирование когнитивной карты экспериментального поля, что является более сложной когнитивной задачей.



Трансляционная биоинформатика в СПбГУ.

Лapidус А. Л.

Революция в молекулярной биологии под названием секвенирование нового поколения (NGS) вывела биологические и медицинские исследования на совершенно новый уровень. Объемы и разнообразие данных, производимых в результате геномного, транскриптомного, протеомного секвенирования настолько велики, что представить их анализ без грамотных алгоритмов, удобных и надежных программ и серьезных компьютерных мощностей совершенно невозможно.

Биоинформатики Центра алгоритмической биотехнологии (ЦАБ) СПбГУ создали целый ряд программ, которые используются во всем мире, помогая восстанавливать геномные последовательности, анализировать активность генов, изучать разнообразие антител, возникающих в ответ на различные стрессы, искать принципиально новые антибиотики, изучая сложнейшие микробные сообщества.

Характерной чертой разработок ЦАБ является их практически моментальное внедрение в практику. Уже на этапе создания того или иного программного продукта к тестированию привлекаются заинтересованные исследователи, что помогает разработчикам получать ранний отклик и корректировать свои планы, если в этом возникает необходимость. В результате такой тесной связи с пользователями создаваемых программ, их иногда начинают цитировать даже раньше, чем они официально опубликованы. Не это ли доказывает острейшую потребность в биоинформатических разработках в исследовательских лабораториях!

Ждут их и в клинических и фармакологических исследованиях. В результате взаимодействия сотрудников лаборатории с исследователями компании АстраЗенека последним удалось создать новый антираковый препарат TAGRISSO™, который был недавно одобрен FDA.

Обзор этих и других научных проектов лаборатории в сочетании с образовательными инициативами будет представлен участникам конференции.



«Поиск генетических факторов, лежащих в основе патогенеза лобно-височной деменции, синдрома беспокойных ног и шизофрении».

Левченко А. Ю.

Введение:

Генетические факторы, лежащие в основе психических и неврологических заболеваний, до сих пор недостаточно изучены. Данные пробелы в наших знаниях ограничивают наши возможности в плане профилактики и лечения этих заболеваний.

Цель исследования:

Целью трёх научных проектов было изучение уже известных и определение новых генетических факторов, лежащих в основе патогенеза лобно-височной деменции (ЛВД), синдрома беспокойных ног (СБН) и шизофрении.

Материалы и методы:

ЛВД: 14 пациентов франко- и англо-канадского происхождения с диагнозом ЛВД. Замороженные ткани мозга, кровь, выделенные ДНК и РНК. Секвенирование гена МАРТ, участвующего в патогенезе ЛВД. Изучение соотношения изоформ 4R/3R гена МАРТ.

СБН: Несколько десятков семей, в том числе очень крупных, франко-канадского происхождения. Кровь, фибробласты, выделенные ДНК и РНК. Полногеномный статистический анализ сцепления. Секвенирование 80 генов в обнаруженных хромосомных участках-кандидатах, подробное изучение гена SIRPB1.

Шизофрения: 95 больных шизофренией из Санкт-Петербурга. Кровь, выделенная ДНК. Секвенирование 10 генов-кандидатов, предположительно определяющих лево-правую асимметрию мозга.

Результаты и их обсуждение:

ЛВД: Был обнаружен функциональный редкий полиморфизм rs63751443 в гене МАРТ у одного больного, который изменяет соотношение изоформ 4R/3R. Дополнительные эксперименты проводятся.

СБН: Были обнаружены два новых хромосомных участка, сцепленных с СБН: 20p13 и 16p12.1. Подтверждение сцепления с ранее описанным участком 14q13-21. Была обнаружена дупликация гена SIRPB1 (20p13), участвующего в иммунной системе. Хотя дупликация этого гена присутствуют и в здоровой популяции, её функциональная роль в таком мультифакториальном заболевании, как СБН, требует дополнительного изучения.

Шизофрения: Были обнаружены 20 новых вариаций, из которых одна вероятно является патогенной мутацией в гене CTNNA1 (бета-катенин) у больной параноидной шизофренией. Данная мутация, заменяющая аспарагин на серин в части белка, взаимодействующей с кадгеринами, нарушает функцию белка, согласно всем использованным инструментам биоинформатики, и полностью отсутствует у здоровых



индивидуумов. Ген CTNNB1 также поражён мутациями, в том числе, в той же функциональной части белка, в случае аутизма и умственной отсталости.

Заключение:

Данные исследования позволили пролить свет на генетические факторы, играющие роль в ЛВД, СБН и шизофрении. Дальнейшие исследования должны подтвердить конкретную роль генов MAPT, SIRPB1 и CTNNB1 в патогенезе.



Биотехнологический центр модификации генома с помощью CRISPR/CAS9 системы: создание TAAR6 нокаутной линии мышей

Леонова Е.И., Гайнетдинов Р.Р.

Институт трансляционной биомедицины СПбГУ, Санкт Петербург

e-mail: 1102.elena@gmail.com

Актуальность темы: Для более глубокого понимания этиологии болезней необходимо их моделирование на лабораторных животных. Для этого требуется направленное введение мутации в гены, которые могут вызвать ту ли иную патологию. Технология редактирования генома эукариотических организмов с использованием CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) / Cas9 (CRISPR-associated nuclease 9) системы позволяет нокаутировать ген у животного уже в первом поколении [1]. CRISPR/CAS9 система базируется на адаптивном иммунитете микроорганизмов, в основе которой лежит внесение направленного с помощью РНК (single guide RNA) двухцепочечного разрыва в ДНК, который репарируется клеткой. В геноме эукариот существует более 130 генов относящиеся к аппарату репарации, которые устраняют поврежденные последовательности ДНК, а затем восстанавливают их с помощью различных ДНК полимераз семейства X - это полимеразы лямбда, мю и бета [2]. Как правило, данные ДНК полимеразы склонны к ошибкам, но способны действовать быстро и в отсутствии матрицы.

Цель проекта: Целью данной работы создание TAAR6 нокаутной линии мышей (TAAR6^{-/-}).

Материалы и методы: Для создания модели TAAR6^{-/-} использовались мыши линии C57 Black/6. В качестве реципиентов, была выбрана аутбредная линия CD1. мРНК CAS9 нарабатывали с матрицы плазмиды *pet28a-Cas9*, которую предварительно подвергали гидролизу эндонуклеазой рестрикции XhoII. SgРНК получали путем синтеза двух праймеров, с дальнейшей их амплификацией методом ПЦР. Транскрипцию sgРНК, мРНК CAS9, а также кэпирование и полиаденилирование мРНК CAS9 проводили с помощью кита mMACHINE T7 ULTRA. Для выделения РНК использовали тризольный метод. Полученные CRISPR/CAS9 РНК конструкции вводили в цитоплазму оплодотворенной яйцеклетки на стадии слияния пронуклеусов в концентрациях 20нг/мкл (sgРНКТАAR6) и 70нг/мкл (мРНКCAS9). Яйцеклетки после успешной инъекции трансплантировали в яйцевод самки-реципиента CD1. У рожденных мышей брали ДНК, амплифицировали фрагмент гена *taar6*, который очистили из агарозного геля с помощью QIAquick Gel Extraction Kit и секвенировали. Полученного самца с мозаичной матрицей по гену *taar6* скрестили с самками линии c57Black дикого типа и в первом поколении получили гетерозиготных особей. Для



определения мутации клонировали исследуемый фрагмент гена *taarb* в плазмиду *pGEM®-T Easy*, выбрали нужный клон, амплифицировали ДНК и секвенировали.

Результаты: Получены гетерозиготные мыши линии TAAR6^{+/-}. Мутация представляет собой вставку из 8 коротких нуклеотидных повторов (CAGAGG).

Заключение: Для выведения TAAR6^{-/-} линии мышей необходимо будет провести ряд последовательных скрещиваний до получения гомозиготных носителей мутации. Судя по характеру мутации, репарация двухцепочечного разрыва пошла по альтернативному пути негомологичного соединения концов. Известно, что ДНК-полимераза-бета способна «зашивать» ДНК после разрыва с помощью синтеза небольших нуклеотидных повторов, например (CAG)_n [3].

Список литературы:

- [1] A. Williams, J. Henao-Mejia, and R. A. Flavell, “Editing the Mouse Genome Using the CRISPR–Cas9 System,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2016, no. 2, p. pdb.top087536, Feb. 2016.
- [2] K. K. Chiruvella, Z. Liang, and T. E. Wilson, “Repair of Double-Strand Breaks by End Joining,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, no. 5, pp. a012757–a012757, May 2013.
- [3] E. Crespan, T. Czabany, G. Maga, and U. Hübscher, “Microhomology-mediated DNA strand annealing and elongation by human DNA polymerases λ and β on normal and repetitive DNA sequences,” *Nucleic Acids Res.*, p. gks186, Feb. 2012.



Различия влияния разных кардиотонических стероидов на первичные культуры нейронов крысы.

Лопачев А.В.

Кардиотонические стероиды (КТС) являются специфическими ингибиторами Na^+, K^+ -АТФазы. Их связывание с Na^+, K^+ -АТФазой вызывает изменение активации внутриклеточных сигнальных каскадов, влияющих на экспрессию генов, процессы пролиферации и апоптоза. При этом на данный момент считается, что КТС являются эндогенными гормонами в организме млекопитающих, в том числе, в центральной нервной системе (ЦНС), где экспрессируются убаин-чувствительные изоформы α субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы: $\alpha 2$, экспрессирующаяся в глии, и нейрон-специфичная $\alpha 3$ изоформа. Известно, что КТС дигоксин, применяющийся при лечении сердечной недостаточности, может вызывать побочные эффекты на ЦНС. Введение убаина в мозг крыс вызывает маниакально-подобное поведение через активацию киназы Akt и MAP киназы ERK1/2 в нейронах. О действии других КТС на нервную ткань известно мало, при том, что КТС применяются в медицине для лечения сердечной недостаточности, а также на основе КТС разрабатываются противоопухолевые препараты. Целью данной работы было сравнить влияние трех КТС, относящихся к разным подклассам, карденолидов убаина и дигоксина и буфадиенолида буфалина, на первичные культуры нейронов крысы, а также изучить механизмы этого влияния. Мы выяснили, что наиболее токсичным для первичной культуры нейронов из трех исследованных КТС является дигоксин: он токсичен в концентрациях от 1 μM , убаин – от 3 μM , а буфалин – от 10 μM . При этом токсичность КТС напрямую не связана со степенью ингибирования Na^+, K^+ -АТФазы, поскольку буфалин ингибирует ферментативную функцию в меньших концентрациях, чем убаин, а убаин в меньших, чем дигоксин. Мы обнаружили, что буфалин и дигоксин, как и убаин, способны вызывать активацию ERK1/2 и p38, но с отличающимися концентрационно-временными профилями. Дигоксин, в отличие от буфалина и убаина, не вызывал уменьшение активации JNK при долговременной инкубации. Мы пришли к выводу, что токсический эффект КТС в концентрациях, вызывающих ингибирование менее 80% активности Na^+, K^+ -АТФазы, связан с активацией ERK1/2, а также с комплексным профилем активации MAP киназ. Прямая корреляция ингибирования активности Na^+, K^+ -АТФазы со степенью активации прослеживается только для ERK1/2, а различия в действии трех КТС на активацию JNK и p38 могут свидетельствовать о том, что она сопряжена с запуском внутриклеточных сигнальных каскадов, реализуемых через белок-белковое взаимодействие Na^+, K^+ -АТФазы с разными белками-партнерами. Активация MAP киназных каскадов для всех трех КТС происходит в тех концентрациях, которые вызывают ингибирование $\alpha 1$ субъединицы, исходя из чего мы предполагаем, что данные сигнальные каскады реализуются через $\alpha 1$. Также мы показали, что увеличение фосфорилирования ERK1/2 не зависит от убаин-



индуцированного увеличения кальция и активации p38. Изменения в фосфорилировании p38, независимо от активации ERK1/2, кальций-зависимы. Изменения в фосфорилировании JNK кальций-зависимы, а также связаны с активацией ERK1/2 и p38. Помимо изменений активации MAP киназ убаин и дигоксин, в отличие от буфалина, вызывают активацию Akt. Полученные результаты показывают, что сигнальные процессы в нейронах, вызываемые КТС, могут различаться не только из-за разных констант ингибирования Na^+, K^+ -АТФазы, и это необходимо учитывать при изучении эндогенных КТС мозга, разработке и использовании препаратов на основе КТС.



Ковалентное связывание пептидного лиганда с SH2 доменом Fyn киназы и его последствия в виде агрегации и снижения структурной стабильности домена

Д.А.Лузик, С.О.Рабдано, С.А.Измайлов, Н.Р.Скрынников

Лаборатория био-ЯМР СПбГУ, Санкт-Петербург 199034

Возможность образования межмолекулярных дисульфидных мостиков (и других типов ковалентных связей) между белками-мишенями и их пептидными лигандами изучаются в контексте создания необратимых (ковалентных) ингибиторов белков, играющих роль в патогенезе различных заболеваний - например, рецепторов, онкобелков и т.д. Тем не менее, на сегодняшний день нет достаточного количества данных о влиянии подобных модификаций на стабильность структуры белков-мишеней и, как следствие, возможных последствиях применения таких подходов на клеточном уровне. Нами был разработан специальный алгоритм для скрининга банка данных PDB и идентификации комплексов белок-пептид, в которых (а) белок представляет из себя потенциальную онкотерапевтическую мишень (например, согласно базе данных NCG5.0) и (б) содержит свободные цистеины, расположенные на поверхности связывания с пептидом. Анализ отобранных структур позволил нам сконструировать пептидные ингибиторы для соответствующих мишеней, имея в виду ковалентное присоединение пептида через находящийся на интерфейсе цистеин. В качестве первого примера мы исследовали влияние ковалентного присоединения модифицированного пептидного лиганда, полученного путем введения мутации G7C в низко-аффинный ингибитор SH2-домена онкогенной киназы Fyn (пептид EPrYQPGENL), на стабильность структуры домена. Нами были оценены условия возникновения ковалентного комплекса белок-лиганд, а также с помощью методов ЯМР-спектроскопии охарактеризованы структурные изменения в домене-мишени. Было выяснено, что несмотря на то, что структура домена в целом сохраняется после связывания с пептидом, некоторые ее участки подвергаются структурным видоизменениям, которые сопровождаются снижением стабильности. В результате этих изменений дисульфид-связанный комплекс белок-лиганд подвергается агрегации и утрачивает растворимость; напротив, нативный (нековалентный) комплекс остаётся растворимым даже при высоких (миллимолярных) концентрациях. Наблюдаемая нами тенденция к частичной потере структурной стабильности и агрегации является потенциально важным фактором при анализе перспектив применения ковалентных пептидных ингибиторов *in vivo*. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (проект №15-14-20038).



Изучение механизмов межвидовой передачи прионов.

Майтова А.В., Гризель А.В., Чернов Ю.О.

Санкт-Петербургский государственный университет; Научная лаборатория биологии амилоидов

Амилоиды - высокоупорядоченные белковые агрегаты фибриллярной природы, для которых характерно формирование межмолекулярных кросс- β -структур. Прионы – инфекционные амилоиды. Особый интерес к прионам вызван тем, что они связаны с развитием целого ряда прионных заболеваний млекопитающих, на настоящий момент все они неизлечимы и смертельны. Передача прионных инфекций между видами млекопитающих ограничена межвидовыми барьерами и может происходить, в основном, между особями одного вида. Однако барьеры между видами не абсолютны и в некоторых случаях прионные инфекции могут передаваться между близкими видами организмов.

Наиболее хорошо изучен прион дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [PSI^+], прионная форма белка Sup35, выполняющего в клетке функции вспомогательного фактора терминации трансляции. Для образования прионных агрегатов при сверхпродукции белка Sup35 или его прионовых доменов необходимо наличие в клетке предсуществующего приона (фактора PIN), который инициирует процесс нуклеации (возникновение приона), предположительно являясь гетерологичной матрицей для образования первых «зерен» приона [PSI^+]. Обычно в роли фактора PIN выступает прионная форма белка Rnq1 – [RNQ^+]. Также в роли фактора PIN может выступать прионная форма Las17-связывающего белка Lsb2 (Pin3).

Детальные механизмы образования приона [PSI^+] в клетках дрожжей и роль фактора PIN в этом процессе до сих пор недостаточно изучены. Детектировать наличие и определить форму агрегатов можно с помощью флуоресцентной метки, слитой с белком Sup35 или его укороченным вариантом, содержащим прионовый домен (Sup35NM).

Ранее было показано, что белки Sup35NM из различных видов дрожжей при сверхпродукции образуют различные по форме агрегаты в клетках *S. cerevisiae* в присутствии [RNQ^+], что может быть связано с изменением взаимодействия дивергентных белков Sup35NM с внутриклеточными компонентами, в частности с фактором PIN.

Целью нашего исследования является выяснить, как замена фактора PIN влияет на степень агрегации и форму образуемых агрегатов белка Sup35NM из разных видов дрожжей сахаромисетов.

В своей работе мы изучаем то, как замена фактора PIN [RNQ^+] на [LSB^+] способствует переходу Sup35NM из разных видов дрожжей в прионную конформацию



[PSI^+], а также изучаем влияние замены PIN фактора на динамику образования и структуру агрегатов.

К настоящему времени, в ходе экспериментов с Sup35 из родственных по отношению к *S. cerevisiae* видов дрожжей (*S. paradoxus*, *S. uvarum*, *N. castellii*) было выяснено, что Lsb2 способен вызывать агрегацию этих белков, однако с меньшей эффективностью, чем в случае с [RNQ^+] в роли фактора PIN. Типы белковых агрегатов в образуемых в присутствии [RNQ^+] и [LSB^+] сходны между собой.

В дальнейшем планируется проверить возможность [LSB^+] выступать в качестве нуклеирующего агента для белков Sup35 из более удаленных видов дрожжей по отношению к *S. cerevisiae* (*Lachancea kluyveri*, *Pichia methanolica*), в клетках *S. cerevisiae*, и изучать динамику агрегации Sup35 в собственных клетках дрожжей этих видов.



Роль затравки агрегации и межвидового переноса прионового состояния у дрожжей.

А.В. Майтова¹, А.В. Гризель¹, А.А. Рубель¹ и Ю.О. Чернов^{1,2}

¹Научная лаборатория биологии амилоидов и Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

²Факультет биологических наук, Технологический институт Джорджии, Атланта, США.

Амилоиды - высокоупорядоченные белковые агрегаты фибриллярной природы, для которых характерно формирование межмолекулярных кросс-β-структур. Прионы – инфекционные амилоиды, которые связаны с развитием целого ряда неизлечимых заболеваний млекопитающих и с поддержанием наследуемых признаков у дрожжей. Передача прионов между видами ограничена межвидовыми барьерами, однако такие барьеры не абсолютны, и в некоторых случаях могут преодолеваться. В настоящее время механизм межвидовой передачи прионов до конца не ясен.

У дрожжей прионы передаются через цитоплазму. Наиболее хорошо изучен прион дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [*PSI*⁺], прионная форма белка Sup35, выполняющего в клетке функции вспомогательного фактора терминации трансляции. Для образования прионных агрегатов при сверхпродукции белка Sup35 или его прионовых доменов необходимо наличие в клетке предсуществующего приона, который инициирует процесс нуклеации (возникновение приона), предположительно являясь гетерологичной матрицей для образования первых «зерен» приона [*PSI*⁺]. В роли предсуществующего приона могут выступать прионная форма белка Rnq1 – [*PIN*⁺] или [*RNQ*⁺], или другие сверхпродуцированные агрегирующие белки, включая белок Lsb2 ассоциированный с актиновым цитоскелетом. Остаётся неизвестным, влияет ли тип предсуществующей «затравки» на межвидовой барьер. Целью нашего исследования является выяснение влияния типа затравки (например, замены Rnq1 на Lsb2) на параметры первоначальной агрегации белка Sup35 и на межвидовой прионный барьер между белками Sup35 дрожжей.

Для изучения процессов образования приона [*PSI*⁺] используются методы фенотипической детекции (по снижению функции белка Sup35 в терминации трансляции) и флуоресцентной микроскопии. В последнем случае возникновение и форма агрегатов детектируются с помощью флуорофора, слитого с фрагментом, содержащим прионовый домен (Sup35NM) из разных видов дрожжей.

Ранее было показано, что белки Sup35NM из различных видов дрожжей при сверхпродукции в присутствии [*RNQ*⁺] образуют различные по форме агрегаты в клетках *S. cerevisiae*, что может быть связано с изменением взаимодействия дивергентных белков Sup35NM с внутриклеточными компонентами.



Нами обнаружено, что белки Sup35 из близкородственных по отношению к *Saccharomyces cerevisiae* видов дрожжей (*S. paradoxus*, *S. uvarum*) могут агрегировать в присутствии сверхпродуцированного эндогенного Lsb2 в клетках *S. cerevisiae*, хотя и с меньшей эффективностью по сравнению с клетками, содержащими прион [RNQ⁺], причём в обоих выявляются как филаменты, так и точечные агрегаты.

В дальнейшем планируется проверить эффект замены приона [RNQ⁺] агрегатами Lsb2 на межвидовой перенос прионового состояния между белками Sup35 разных видов, исследовать способность Lsb2 *S. cerevisiae* нуклеировать агрегацию белков Sup35 из более удаленных видов дрожжей (*Lachancea kluyveri* и *Pichia methanolica*) в клетках *S. cerevisiae* и изучить агрегацию Sup35NM в клетках дрожжей удалённых видов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-50-00069, РФФИ №15-04-08159 и №15-04-06650. Для выполнения исследований использовалась приборная база ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС», «МиКТ» и Центра «Биобанк» научного парка СПбГУ.



Сравнительный анализ тестов тревожного поведения *Danio rerio*, основанных на конфликте новизны

Д. А. Мешалкина, Э. В. Кисель, Э. Э. Фрик, Д. Д. Эчеварриа, Д. Б. Розенберг, К. Максимино, М. Г. Лима, М. С. Абреу, А. К. Джакомини, Л. Д. Г. Барселлос, Ц. Сонг, А. В. Валуев

лаб. Биологической Психиатрии, ИТБМ СПбГУ

Тревожность - это широко распространённое аффективное расстройство, которое может являться триггером для запуска более серьёзных психических заболеваний. Поэтому разработка препаратов для фармакологической коррекции тревожности является важным направлением исследований в лечении и предотвращении аффективных расстройств. Новой и перспективной платформой для скрининга таких препаратов является *Danio rerio*, для которых тесты тревожного поведения оказались наиболее интенсивно разрабатываемыми из всех поведенческих. В данном исследовании мы сфокусировались на сопоставлении двух наиболее популярных тестов: новой камеры (основанном на геотаксисе) и чёрно-белой камеры (основанном на скототаксисе), чтобы выявить их особенности и преимущества. Мы провели мета-анализ опубликованной литературы и подтвердили его результаты экспериментами *in vivo* и тестированием уровня кортизола. Мета-анализ продемонстрировал одинаковую чувствительность обоих тестов к тревого-подобным состояниям. Эксперименты *in vivo* также продемонстрировали хорошую корреляцию между результатами обоих тестов. Определение уровня кортизола показало, что тест новой камеры вызывает более сильное увеличение уровня кортизола, чем тест чёрно-белой камеры. Полученные данные позволяют утверждать, что между двумя исследованными видами тестов возможна взаимозаменяемость, но только при учете комплексной оценки нескольких показателей полученных в каждом тесте. При этом разработка интегрального показателя для оценки тревого-подобного поведения у *Danio rerio* оказалась актуальной и интенсивно обсуждаемой задачей, подходы к решению которой также рассматриваются в данной работе. Это позволит стандартизировать процедуру скрининга анксиолитических препаратов на модели *Danio rerio*.

Исследование было проведено при поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ) 16-04-00851А.



Действие хронического амитриптилина на поведение и метаболизм нейротрансмиттеров у *Danio rerio*

Д. А. Мешалкина, Э. В. Кисель, К. А. Антонова, Е. В. Ефимова, К. А. Дёмин, Т. О. Колесникова, С. Л. Хацко, А. В. Калуев.

лаб. Биологической Психиатрии, ИТБМ СПбГУ

Амитриптилин является широко используемым трициклическим антидепрессантом, мощно ингибирующим обратный захват серотонина и, гораздо слабее, - норэпинефрина. Интерес к этому давно разработанному препарату постепенно возвращается благодаря широкому диапазону эффектов, которые находят применение не только при депрессии и биполярном расстройстве, но и при синдроме дефицита внимания и болезни Паркинсона. В данной работе короткохвостым *Danio rerio* вводили две хронические дозы амитриптилина (10 и 50 мкг/л) в течение двух недель (по 8 особей на группу). Поведение в тесте новой камеры записывали в течение 6 минут и анализировали с помощью Ethovision XT 11.5 (Noldus IT, Netherlands). Мозг целиком препарировали на льду, экстрагировали соникацией в 0,1 М растворе перхлората и определяли моноамины на колонке CA-5ODS (Eicom, USA). Для определения уровня тирозин гидроксилазы цельные препараты мозга рыб лизировали в буфере low RIPA и проводили Western blot с антителами sc-14007 (Santa Cruz). Данные анализировали с помощью рангового теста Крускаля-Уоллеса с пост-хок тестом множественного сравнения по Данну. Рыбы, которым вводили амитриптилин, демонстрировали ряд поведенческих изменений: гиполокомоцию (короче пройденное расстояние 767 ± 109 vs 1713 ± 154 см, $p=0,00089$ при максимальной концентрации препарата) и задержка выхода наверх ($2,69 \pm 0,7$ vs $106,97 \pm 11,5$ сек, $p=0,00099$), но больше время наверху (273 ± 10 vs 101 ± 18 сек, $p=8,90E-05$) и число выходов наверх ($3,7 \pm 1,5$ vs $11,5 \pm 2,9$, $p=0,0095$). Анализ уровней нейротрансмиттеров в мозгу инкубированных рыб позволил выявить мощное падение оборота серотонина ($0,180 \pm 0,012$ при 10 мкг/л and $0,179 \pm 0,014$ при 50 мкг/л vs $0,296 \pm 0,009$, оба $p=0,00179$) и значимое увеличение уровня норэпинефрина (865 ± 42 пг/мг ткани vs 668 ± 58 пг/мг, $p=0,03789$), которые были ожидаемы исходя из известных характеристик связывания амитриптилина с транспортёрами серотонина и норэпинефрина. Примечательно, что острое и хроническое введение амитриптилина приводит к одинаковой диаде гиполокомоции и выхода наверх, при этом оба показателя коррелируют с усилением серотонергического тона, которое было охарактеризовано ранее как релевантное для серотонинового синдрома (Stewart et al., 2013). Интересно, что более ранние исследование острых эффектов амитриптилина выявили изменения только в серотониновой, но не норэпинефриновой нейротрансмиссии у *Danio rerio* (Demin et al., 2017), в то время как настоящее исследование выявило изменение в обеих системах (что позволяет предположить достаточное действие амитриптилина на



норэпинефриновый транспортёр только при хронической инкубации). Более того, мы обнаружили увеличение уровня допамина у рыб, инкубированных с амитриптилином (335 ± 20 vs 254 ± 10 пг/мг, $p=0,03969$), которое указывает на дополнительное не прямое действие этого вещества. Чтобы исследовать эту возможность, мы определили уровень ключевого фермента в синтезе допамина – тирозин гидроксилазы (ТН) и обнаружили небольшое, но значимое увеличение его уровня ($121,9 \pm 6,3$ % от контроля, $p=0,03913$), которое может быть причиной вышеописанного увеличения содержания допамина и норэпинефрина. В целом, высокая чувствительность *Danio rerio* к хроническому амитриптилину поможет прояснить сложный психофармакологический профиль этого и сходных веществ и ускорить развитие аквариальных животных моделей токсиндромов человека.

Исследование было проведено при поддержке: Биоэлектронного комплекса Обсерватории Экологической Биобезопасности СПбГУ (содержание лабораторных рыб) и гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ) 16-04-00851А.



Роль TAAR1 в регуляции дофаминовой нейротрансмиссии в стриатуме: оптогенетическое исследование.

Михайлова М.А.¹, Гайнетдинов Р.Р.¹, Будыгин Е.А.^{1,2}

¹ *Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

² *Neurobiology and Anatomy, Wake Forest School of Medicine, United States of America*

В настоящее время ряд исследований показывает, что активация рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами 1 типа (TAAR1) может представлять собой терапевтический потенциал для лечения некоторых заболеваний, таких как шизофрения и аддикции. Несмотря на то, что несколько исследований демонстрируют способность TAAR1 к модуляции дофаминовых ауторецепторов, точный механизм данного воздействия на отдельные паттерны дофаминовой передачи неизвестен. В настоящем исследовании, с помощью методов оптогенетики и вольтметрии, показан эффект воздействия частичного агониста TAAR1, RO5263397, на пресинаптическую дофаминовую трансмиссию. Во-первых, нами было установлено, что высокая частота стимуляции (50 Гц) вентральной области покрышки (VTA) может вызывать фазический паттерн дофаминового высвобождения в терминалях прилежащего ядра (NAcc), которое характеризуется высоким и быстрым повышением дофаминовой концентрации (~100-600 нМ). Низкие частоты стимуляции (5, 10 Гц) вызывали относительно невысокое, но продолжительное повышение концентрации дофамина в NAcc (~40-100 нМ). Во-вторых, был оценен эффект воздействия RO5263397 (10 мг/кг, i.p.) на тонический и фазический паттерны дофаминового высвобождения *in vivo*. Экспериментальные данные показали значительное влияние лекарственного средства на амплитуду оптически вызванного дофаминового сигнала ($P < 0.0001$). Важно отметить, что препарат снижал фазический дофамин сильнее, чем тонический ($P < 0,05$). Наконец, так как известно, что существуют различия в регуляции дофаминового сигналинга в различных областях головного мозга, мы исследовали локальное воздействие вещества RO5263397 на электрически вызванный дофамин в оболочке (NA shell), сердцевине (NA core) прилежащего ядра и дорсального стриатума (DS) на срезах головного мозга. Высокие концентрации вещества снижали высвобождение дофамина в NA core ($P < 0,05$), и DS ($P < 0,05$). Кроме того, значительная разница между NA shell и DS наблюдалась при применении препарата при концентрации 100 мкМ ($P < 0,01$). Высвобождение дофамина в области NA shell было менее чувствительным к применению RO5263397 по сравнению с NA core и DS. Результаты данного исследования дают важную информацию о модуляции различных паттернов высвобождения дофамина через TAAR1 *in vivo* и выявляют специфику региона при прямом воздействии препарата на дофаминовые терминали.



Сверхпродукция белка Sfp1 приводит к $[PSI^+]$ -зависимой летальности у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которая компенсируется сверхпродукцией Sis1.

Андрей Матвеевко^{1,2,3}, Полина Дроздова^{2,3}, Михаил Белоусов², Светлана Москаленко^{1,2}, Станислав Бондарев^{2,3}, Юрий Барбитов², Антон Нижников^{1,2,4}, Галина Журавлева^{2,3}

¹ СПб Филиал Института общей генетики им. Вавилова РАН

² СПбГУ, кафедра генетики и биотехнологии

³ СПбГУ, Лаборатория амилоидов,

⁴ ВНИИ сельхозмикробиологии РАН

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* – удобный модельный объект для изучения регуляции терминации трансляции и механизма прионизации белков. В терминации трансляции у эукариот принимают участие белки eRF1 и eRF3, кодируемые у дрожжей генами *SUP45* и *SUP35* соответственно. Белок Sup35 (eRF3) способен формировать амилоидные агрегаты, что может приводить к возникновению приона $[PSI^+]$, и как следствие, снижению эффективности терминации трансляции. Моделью для изучения эффективности трансляции является анализ супрессии нонсенс-мутаций, приводящих к преждевременному появлению стоп-кодона в открытой рамке считывания.

Мы показали, что сверхэкспрессия гена, кодирующего транскрипционный фактор Sfp1, приводит к усилению экспрессии *SUP35*, что ведет к усилению нонсенс-супрессии и к прион-зависимой летальности в присутствии $[PSI^+]$. В результате происходит увеличение количества агрегированного и уменьшение мономерного белка Sup35 в клетке. Как оказалось, сверхпродукция полноразмерного белка Sfp1, но не его укороченного варианта (продукта гена *SFP1-fs636*) приводит к наблюдаемому явлению. Известно, что токсичность $[PSI^+]$ компенсируется сверхэкспрессией *SUP45*, однако, в случае, когда токсичность вызвана сверхэкспрессией гена *SFP1*, этого не наблюдается. Мы проверили влияние шаперонов, участвующих в поддержании $[PSI^+]$, и выяснили, что токсичность $[PSI^+]$ компенсируется при участии шаперона семейства Hsp40, Sis1. С помощью денатурирующего гель-электрофореза в агарозном геле мы показали, что Sfp1 может формировать детергент-устойчивые агрегаты. Кроме того, сверхпродукция Sfp1 приводила к увеличению размера агрегатов $[PSI^+]$, а коэкспрессия *SIS1* и *SFP1* возвращала размер агрегатов $[PSI^+]$ к исходным параметрам. С помощью флуоресцентной микроскопии мы показали, что Sfp1 частично колокализован как с Sis1, так и Sup35 в штамме $[PSI^+]$. Таким образом, не исключено, что Sfp1 приводит к $[PSI^+]$ -зависимой летальности с помощью различных механизмов.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (16-04-00202), гранта СПбГУ (1.37.291.2015), а также ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.



Исследование подходов нейропротезирования функций спинного мозга.

Мусяенко П.Е.^{1,2,3}

¹Лаборатория нейропротезов, Институт трансляционной биомедицины СПбГУ;

²Лаборатория физиологии движений, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН;

³Лаборатория нейромоделирования, Российский научный центр
радиологии и хирургических технологий.

Поражения спинного мозга разного генеза (наследственные нейродегенеративные заболевания, пороки развития, опухоли, травмы и др.), сопровождающиеся параличами и тяжелыми висцеральными расстройствами, представляют собой комплексную медико-социальную проблему. Актуальным является разработка эффективных лечебных подходов, что требует изучения нейронных сетей на экспериментальных моделях, выявления механизмов их работы в норме и патологии, создания технологий восстановления.

В ходе исследований методов нейропротезирования нами выявлены структурные и функциональные особенности нейронных сетей спинного мозга. Внутриспинальная мультиклеточная регистрация электродными матрицами позволила проанализировать активность нейронов в разных участках серого вещества поясничного утолщения. Выделены нейрональные популяции, отвечающие за генерацию локомоторной активности и сенсомоторный контроль различных фаз цикла шага. Иммуногистохимическими методами (c-fos, NO-synthase, 28 kDa calbindin, BDA, fastblue и др.) выполнено детальное исследование распределения в сером веществе спинного мозга нейронов, задействованных в контроле движения и висцеральных систем. Показано, что при ходьбе в активность вовлекаются не только собственно локомоторные нейронные сети, но и области, отвечающие за висцеральный контроль, причем степень вовлечения в активность висцеральных нейронов зависит от особенностей локомоторного паттерна и, в частности, от направления ходьбы.

Найдены электрофизиологические и фармакологические подходы для управления сенсомоторными и висцеральными функциями на моделях парализованных животных. Предложен алгоритм стимуляции спинного мозга электродными матрицами, который воспроизводит естественную динамику активации моторных нейронов во время передвижения. Такая пространственно-временная нейромодуляция эффективно восстанавливала качество ходьбы, способности к поддержке веса тела, выносливость и координацию при локомоции у животных с тяжелыми спинальными повреждениями. Разработана хирургическая методика вживления, точного позиционирования и стабилизации имплантатов в спинном мозге, которая во многом определила их биосовместимость, а также высокую функциональность в ходе длительных хронических экспериментов. Проведен анализ методов энергообеспечения



имплантируемых устройств, отработаны схемотехнические подходы для реализации требуемой миниатюризации и бесконтактной зарядки. Апробирован спектр материалов для нейропротезов, включая наноуглеродные конструкции, композиты силикона с углеродными нанотрубками или металлами. Проведена оценка их механических, электрических и биологических свойств, а также созданы первые образцы нейрональных имплантов на их основе.

Работа проводилась при поддержке грантов РФФИ 17-04-01822-а, РФФИ 17-29-01034-офи_м, РНФ 14-15-00788 и гранта президента РФ МД 1018.2017.7.



Применение ЯМР эксперимента с диффузионным фильтром для детектирования сигнала гибкой части амилоидных фибрилл Sup35NM.

Двинских С.В.¹, Кампф К.¹, Подкорытов И.С.¹, Скрынников Н.Р.¹ Белоусов М.В.², Бондарев С.А.², Журавлёва Г.А.².

¹Лаборатория био-ЯМР СПбГУ, Санкт-Петербург 199034

²Кафедра генетики и биотехнологии, СПбГУ, Санкт-Петербург 199034

Белок Sup35 играет роль фактора терминации трансляции в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Прионная форма этого белка используется в качестве модели при изучении прионных заболеваний высших организмов. При этом наибольшее внимание привлекает амилоидогенная часть этого белка Sup35NM. Один из вопросов, остающийся не до конца выясненным, это состояние домена М белка Sup35NM в составе фибрилл: является ли М домен частью полностью жёсткой фибриллярной архитектуры или сохраняет частичную подвижность и разупорядоченность? При исследовании гибких элементов белковых фибрилл методом ЯМР главным образом используют два типа экспериментов: (i) HSQC твёрдых образцов с вращением под магическим углом и (ii) HSQC растворов с неподвижными образцами. В обоих случаях обычно предполагается, что весь белок находится в фибриллярном состоянии. Однако в общем случае это предположение неверно. Белковые фибриллы всегда находятся в состоянии динамического равновесия с мономерными и олигомерными частицами. Наши диффузионные ЯМР эксперименты на образце твёрдых фибрилл показывают, что около 20% сигнала происходят от мономеров Sup35NM, тогда как оставшиеся 80% принадлежат гибким частям истинных фибрилл. Мы также приготовили разбавленный раствор образца Sup35NM, где 85% сигнала принадлежат мономерам, а 15% фибриллам. Серия диффузионных и релаксационных экспериментов выполненных на этом образце даёт самосогласованную картину динамического равновесия между мономерами и фибриллами, находящимися в состоянии медленного обмена. Присоединение диффузионного фильтра к стандартной последовательности HSQC ЯМР эксперимента позволило нам получить сигналы, принадлежащие исключительно гибким частям истинных фибрилл. Наконец, использование образца фибрилл Sup35NM с селективно мечеными ¹⁵N валинами дало возможность определить границу между жёсткой и гибкой частями фибрилл. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №15-14-20038).



Алгоритмические задачи в de novo сборке транскриптомов и метатранскриптомов

Пржибельский Андрей, Бушманова Елена, Антипов Дмитрий

Центр Алгоритмической Биотехнологии, СПбГУ

Технологии секвенирования следующего поколения (NGS) открыли новые возможности для изучения нуклеиновых последовательностей. С появлением протокола RNA-Seq за один эксперимент стало возможным прочитать транскриптом целиком. Для обработки большого количества данных RNA-Seq были разработаны различные программные продукты. Наибольшей популярностью на сегодняшний день пользуются утилиты для выравнивания прочтений РНК на геном (TopHat2 [1], STAR [2]) и последующей оценки дифференциальной экспрессии (Deseq2 [3], Cufflinks [4]). Однако, применение этих методов возможно только к модельным организмам, для которых известен референсный геном и база генов, таким, как человек и мышь. В случае, когда геном неизвестен необходимы альтернативные методы обработки данных RNA-Seq.

De novo сборка (с нуля) данных RNA-Seq может быть полезна когда, например, секвенирование и сборка генома в силу его сложности и размера требуют заметных финансовых, вычислительных и человеческих ресурсов. Сборка транскриптома с нуля также используется в метатранскриптомных проектах и исследованиях, нацеленных на поиск фьюжн генов (fusion genes), способных вызывать раковые заболевания.

Сборка транскриптома из коротких прочтений с нуля является алгоритмически сложной задачей, которую нельзя назвать решенной. Основными проблемами являются ошибки секвенирования, крайне неравномерное покрытие данных (из-за различных уровней экспрессии у различных генов), а также наличие различных изоформ у одного гена и присутствие паралогичных генов.

Раздел биоинформатики именуемый метагеномикой исследует целые бактериальные сообщества. При секвенировании, как правило, ДНК или РНК выделяются из всех бактерий сразу, что заметно усложняет последующий анализ данных, так как неизвестно, какие виды присутствуют в колонии и какие прочтения принадлежат каким бактериям. Так, в метатранскриптомике покрытие еще большее варьируется не только из-за различного уровня экспрессии, но из-за различной представленности видов в бактериальных колониях. Также, несмотря на простую структуру генов прокариот, в метатранскриптомных данных могут присутствовать прочтения с паралогичных



и родственных генов из разных организмов, что, безусловно, затрудняет задачу сборки.

В данной работе мы представляем новый *de novo* ассемблер для данных RNA-Seq, именуемый *rnaSPAdes*. Этот программный продукт был разработан на основе геномного сборщика *SPAdes* [5] и на сегодняшний день демонстрирует результаты, по многим параметрам превосходящие аналогичный программные продукты, такие как *Trinity* [6] и *Trans-ABYSS* [7]. Для сравнения различных транскриптомных ассемблеров и оценки качества сборки нами также был разработана утилита *rnaQUAST* [8].

Литература

Kim, Daehwan, et al. "TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions." *Genome biology* 14.4 (2013): R36.

Dobin, Alexander, et al. "STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner." *Bioinformatics* 29.1 (2013): 15-21.

Love, Michael I., Wolfgang Huber, and Simon Anders. "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." *Genome biology* 15.12 (2014): 550.

Trapnell, Cole, et al. "Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks." *Nature protocols* 7.3 (2012): 562-578.

Bankevich, Anton, et al. "SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing." *Journal of computational biology* 19.5 (2012): 455-477.

Grabherr, Manfred G., et al. "Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome." *Nature biotechnology* 29.7 (2011): 644-652.

Robertson, Gordon, et al. "De novo assembly and analysis of RNA-seq data." *Nature methods* 7.11 (2010): 909-912.

Bushmanova, Elena, et al. "rnaQUAST: a quality assessment tool for de novo transcriptome assemblies." *Bioinformatics* 32.14 (2016): 2210-2212.



**Потеря структуры и агрегация белка при возникновении
дисульфидных мостиков под воздействием окислительного стресса:
пример домена RRM2 из нейропатологического белка TDP-43.**

Рабдано С.О.,¹ Измайлов С.А.,¹ Лузик Д.А.,¹ Гроувз, А.,²
Подкорытов И.С.,¹ Скрынников Н.Р.^{1,2}

¹ *Лаборатория био-ЯМР СПбГУ, Санкт-Петербург 199034*

² *Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette IN 47907, USA*

В работе рассматривается поведение второго РНК-распознающего домена (RRM2) нейропатологического белка TDP-43 в условиях окислительного стресса моделируемого *in vitro*. Для изучения этой системы используется специально адаптированная версия эксперимента по Н/D обмену, измерения ЯМР-релаксации и диффузии, динамическое рассеяние света, контролируемый протеолиз, гель-электрофорез, сайт-направленный мутагенез и моделирование методом молекулярной динамики с длиной траекторий в несколько микросекунд. В условиях окислительного стресса RRM2 формирует дисульфид-связанные димеры, которые претерпевают разворачивание и затем самоорганизуются в агрегатные частицы. Эти частицы имеют неупорядоченную природу, сильно неоднородны по структуре и уязвимы к протеолитическому расщеплению. Некоторые из них устойчивы к обработке дитиотреитолом. Совместная интерпретация данных динамического рассеяния света и данных коэффициентов диффузии позволила аппроксимировать функцию распределения агрегатных частиц по размерам. Ключевым моментом для процесса агрегации является пониженная способность дисульфид-связанных димеров RRM2 к рефолдингу и повышенная склонность к неправильному сворачиванию, что делает их уязвимыми для значительных тепловых флуктуаций. Полученная общая картина представляет пример того, как окислительный стресс может вносить вклад в нейродегенеративные заболевания, сопровождаемые разворачиванием белков, агрегацией и протеолитическим расщеплением. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (проект №15-14-20038).



Новое взаимодействие между группой NH_3^+ лизина и карбонилами основной цепи, дополняющее водородные связи.

О.Н.Рогачёва,¹ С.А.Измайлов,¹ Л.В.Слипченко,² Н.Р.Скрынников^{1,2}

¹ Лаборатория био-ЯМР СПбГУ, Санкт-Петербург 199034

² Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette IN 47907, USA

Анализируя взятую из PDB выборку структур белков, определенных с разрешением не менее 1.5 Å, мы обнаружили ранее не описанное в литературе взаимодействие между $\text{N}^\zeta\text{H}_3^+$ группой боковой цепи лизина и атомом O карбонильной группы, входящей в основную цепь белка. От водородной связи новое взаимодействие отличает линейное расположение атомов C^ϵ , N^ζ и O и преимущественно электростатический характер в вакууме, как следует из проведенного нами разложения энергии на составляющие методом ALMO EDA.

Для детального квантово-химического анализа выявленного взаимодействия мы использовали модельную систему “N-метилацетамид - метиламмоний”, метод теории функционала плотности wB97x-d, корреляционно-согласованный поляризационный валентно-расщепленный базис cc-pVQZ и модель неявного растворителя (воды) C-PCM. С применением такого подхода мы установили, что конформация, характеризующаяся расстоянием $\text{N}^\zeta\text{-O}$ равным 2.7 Å и углом $\text{C}^\epsilon\text{-N}^\zeta\text{-O}$ равным 180°, соответствует седловой точке с минимумом по расстоянию, максимумом по углу и энергией взаимодействия между N-метилацетамидом и метиламмонием, равной 2 ккал/моль. Образование метиламмонием трех водородных связей превращает седло в истинный минимум, и такие взаимодействия преобладают в исследованной нами выборке из PDB.

Для понимания роли рассматриваемого линейного взаимодействия в поддержании структуры белка мы оценили предпочтения лизина и карбонильной группы к нахождению в том или ином элементе вторичной структуры. Оказалось, что лизин, образующий линейное взаимодействие, с одинаковой частотой встречается во всех элементах вторичной структуры, в то время как карбонильная группа имеет предпочтение к поворотам и редко встречается в β -слоях. В спиральных, в зависимости от типа, к образованию линейного взаимодействия способны преимущественно лишь несколько C-концевых карбонильных групп. Как показал статистический анализ, C-концевые карбонильные группы в α -спиральных и 3_{10} -спиральных часто формируют линейные взаимодействия с NH_3^+ группами лизина. По всей видимости, это взаимодействие является важным фактором, стабилизирующим C-терминальные концы спиралей. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (проект №15-14-20038).



Аминокислотные замены в С-терминальном домене Sup35p в сочетании с прионом [PSI+] нарушают жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Рогоза Т.М.^{1,2}, Землянко О.М.^{2,3,4}, Максютенко Е.М.², Журавлева Г.А.^{2,3}

¹СПбФ ИОГен РАН,

²каф.генетики и биотехнологии СПбГУ,

³лаборатория биологии амилоидов СПбГУ,

⁴СПбНЦ РАН

У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* жизненно важные гены *SUP45* и *SUP35* кодируют факторы терминации трансляции eRF1 и eRF3, соответственно. Мутации в этих генах могут приводить к нонсенс-супрессии - прочтению преждевременных стоп кодонов как значащих. Аллели гена *SUP35* из Петергофских (*SUP35ПГЛ*) и Берклийских (*SUP35GB*) генетических линий отличаются по последовательности (и эти различия можно выявить с помощью рестрикционного анализа), однако этот полиморфизм не имеет фенотипического проявления. Белок Sup35 условно разделяют на С, М и N домены. С-домен отвечает за функции Sup35p в терминации трансляции, а N-домен необходим для перехода Sup35p в прионную форму, [PSI+]. Ранее было показано, что сочетание приона [PSI+] и некоторых мутаций в генах *SUP45* и *SUP35* приводит к летальности штаммов дрожжей. В нашей работе мы изучали взаимное влияние миссенс-мутаций (*sup35-10*, *sup35-25*, *sup35-228*), затрагивающих неприоногенный С-домен гена *SUP35*, и приона [PSI+]. Эти мутации были получены на разном генотипическом фоне: *sup35-10* и *sup35-25* на штамме ПГЛ, в то время как *sup35-228* - на штамме GB.

Штамм [PSI+] (*ade1-14 his7-1 sup35D* [*SUP35GB URA3*]), имеющий фенотип Ade+His-, трансформировали плазмидами, маркированными геном *LEU2* и содержащими мутации *sup35-10ПГЛ*, *sup35-25ПГЛ* или *sup35-228GB*. На первом этапе анализировали фенотип трансформантов. Мутации *sup35-10*, *sup35-25*, *sup35-228* характеризуются доминантным проявлением. Трансформанты штамма [PSI+], содержащие две плазмиды, несущие аллель *SUP35GB* и мутантную аллель, сохраняли исходный фенотип Ade+His-, что позволяет предположить отсутствие мутантной аллели; в то время как трансформанты контрольного [*psi*-] штамма, содержащие те же две плазмиды, имели фенотип Ade+His+, что свидетельствует о присутствии мутантной аллели. На следующем этапе проводили замещение плазмиды с аллелью *SUP35GB* на плазмиду с мутантной аллелью на среде, содержащей 5-ФОА. Это событие происходило с различной эффективностью: так для мутации *sup35-10* выживало только 17% трансформантов, для *sup35-25* – 40%, и для *sup35-228* - 67%. При этом стоит отметить, что основная часть клонов с лейциновыми плазмидами, вне зависимости от мутантной аллели на этой плазмиде, имела фенотип Ade+His-,



характерный не для мутации, а для [PSI+], и только менее 10% клонов имели фенотип Ade+His+, характерный для мутантных аллелей. Далее [PSI+]-статус полученных клонов проверяли с помощью метода SDD-AGE и показали, что клоны с фенотипом Ade+His- сохраняли агрегаты [PSI+], а клоны с фенотипом Ade+His+ утрачивали прион [PSI+]. На заключительном этапе с помощью рестрикционного анализа обнаружили, что трансформанты [PSI+], несущие плазмиду с *LEU2*, содержали аллель гена *SUP35GB* дикого типа, в то время как трансформанты Ade+His+, потерявшие прион, сохранили мутантную аллель *sup35-10ПГЛ* или *sup35-25ПГЛ*. Для плазмид с мутацией *sup35-228GB*, было проведено секвенирование, и показано, что лейциновая плаزمид из клонов Ade+His-, также несет аллель дикого типа.

Итак, практически у всех (90%) выживших трансформантов происходила замена мутантной аллели на аллель дикого типа *SUP35GB*, по-видимому, благодаря гомологичной рекомбинации. Стоит отметить, что эффективность трансформации была снижена на порядок у штаммов [PSI+] по сравнению со штаммами [psi-], и еще на порядок трансформация была менее эффективна для плазмид с мутантными аллелями, по сравнению с аллелью *SUP35ПГЛ*. Таким образом, можно утверждать, что миссенс-мутации *sup35-10*, *sup35-25* и *sup35-228*, затрагивающие жизненно важный С-домен белка Sup35, в сочетании с прионом [PSI+] приводят к гибели клеток. Такой эффект может быть связан с тем, что количество свободного мутантного белка Sup35, который сам по себе хуже выполняет свои функции, в присутствии [PSI+] уменьшается.

Работа получила финансовую поддержку гранта СПбГУ 1.37.291.2015, а также ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.



Роль повторяющихся элементов генома в эволюции генетического определения пола

Сайфидинова А.Ф.¹, Комиссаров А.С.², Галкина С.А.³, Кошель Е.И.⁴,
Четверикова Р.С.⁵, О'Брайен С.Д.², Гагинская Е.Р.⁴

¹Ресурсный центр ЦКП «Хромас», Научный парк, СПбГУ

²Центр геномной биоинформатики им. Ф.Г. Добржанского, СПбГУ

³Кафедра генетики и биотехнологии, Биологический факультет, СПбГУ

⁴Кафедра цитологии и гистологии, Биологический факультет, СПбГУ

⁵Кафедра зоологии позвоночных, Биологический факультет, СПбГУ

В геноме птиц общее содержание повторяющихся последовательностей существенно ниже, чем в геномах представителей других классов позвоночных (Zhang et al. 2014). Однако из-за ограниченных возможностей технологий секвенирования полных геномов далеко не все тандемно повторяющиеся последовательности выявлены и охарактеризованы. В ходе проводимых нами исследований генома курицы мы выявили и охарактеризовали новый тандемный повтор (GGAAA)_n. У самок этот повтор оказался вторым по копияности (1,2-1,6%) после теломерного (3-4% по данным Delany et al., 2003). Для локализации (GGAAA)_n использовали флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) с синтетическим олигонуклеотидом, меченым флуорохромом 6-FAM (Stepakov et al., 2015) в качестве зонда. На митотических хромосомах по одному яркому сигналу гибридизации было отмечено на обоих плечах половой хромосомы W, детально их локализацию невозможно определить из-за малого размера хромосомы. Для анализа с наиболее высоким разрешением использовали FISH на гигантских хромосомах типа ламповых щеток из растущих ооцитов (Saifitdinova et al., 2003; Galkina et al., 2006). Хромосома W курицы на стадии ламповых щеток сильно конденсирована и в ней хорошо различимы 7 хромомеров (Solovei et al., 1996; 1998). Флуоресцентные сигналы гибридизации с зондом (GGAAA)_n нами детектированы во втором и седьмом хромомерах. В то же время, по результатам анализа собранного и опубликованного генома курицы *Gallus_gallus-5.0*, этот повтор не входит в состав хромосомы W. С помощью разных методов анализа мы смогли выявить лишь незначительное число полей данного повтора вне группы сцепления W, включая хромосомы 1, 2, 3, 24 и Z с обогащением на хромосоме 1. Это обстоятельство мы объясняем тем, что опубликованная карта секвенированных последовательностей хромосомы W содержит значительные пробелы и содержит только 7,08 млн.п.о. при ожидаемом размере около 50-55 млн.п.о. (Kodama et al., 1987; Bellott et al., 2017). В то же время известно, что около 70% W-хромосомы курицы составляют повторяющиеся последовательности, среди которых охарактеризованы семейства *XhoI*, *EcoRI* и *SspI*B (Kodama et al., 1987; Saitoh et al., 1991; Itoh, Mizuno, 2002). В сумме они составляют около 44 млн.п.о. и еще как минимум 6 млн.п.о. приходится на долю все еще не



идентифицированных повторяющихся последовательностей (Itoh, Mizuno 2002; Mizuno et al., 2002). Совместная FISH на ламповых щетках курицы показала, что описанный нами элемент не колокализуется ни с одним из ранее известных W-специфичных повторов. Интересно, что повторяющаяся последовательность (GGAAA) n была описана ранее в составе 5' транскрибирующейся некодирующей области гена овотрансферрина у фазана, а в геноме курицы описаны 2 родственных повтора в составе регуляторных областей генов, отвечающих за дифференцировку гонад (Maroteaux et al., 1983). Также повтор (GGAAA) n описан в составе регулируемого промотора гена промежуточного нейрофиламента (NF-M) курицы (Zopl et al., 1990). Мы идентифицировали еще 13 генов, в составе промоторных областей которых присутствует повторяющийся элемент (GGAAA) n . Мы предполагаем, что тандемный повтор, аккумулирующийся на гетероморфной половой хромосоме, может играть важную регуляторную роль в онтогенезе самок.

Настоящее исследование поддержано грантом РФФИ №16-04-01823. Для выполнения исследования были использованы ресурсы Центра геномной биоинформатики им. Ф.Г. Добржанского и Ресурсного центра ЦКП «Хромас» Научного парка СПбГУ.



**Обзор исследований в области экспериментальной биофизики,
клеточной биологии и компьютерного моделирования, проводимых в
Лаборатории биомолекулярного ЯМР СПбГУ.**

Двинских С.В.(1), Измайлов С.А.(1), Кампф К.(1), Люблинская О.Г.(1),
Лузик Д.А.(1), Михайловский О.В.(1), Подкорытов И.С.(1),
Рабдано С.О.(1), Рогачёва О.Н.(1), Саликов В.А.(1), Скрынников Н.Р.(1),
Тюряева И.И.(1), Шабан А.(1), Белоусов М.В. (2), Бондарев С.А.(2),
Г.А.Журавлёва Г.А.(2), Слипченко Л.В.(3)

(1)Лаборатория био-ЯМР СПбГУ, Санкт-Петербург 199034

(2)Кафедра генетики и биотехнологии, СПбГУ, Санкт-Петербург 199034

(3)Department of Chemistry, Purdue University, West-Lafayette IN 47906, USA

I. Противоопухолевые пептиды семейства GO были разработаны и коммерциализированы на медицинском факультете Гарвардского университета в качестве ингибиторов димеризации известного онкобелка муцин 1. В своей работе мы показали, что цитотоксическая активность пептидов этого семейства распространяется также на нормальные клетки и не зависит от уровня экспрессии муцина 1. Чтобы исследовать механизм действия этих пептидов, мы сконструировали и испытали ряд новых последовательностей, содержащих ключевой мотив CxS или CxxS. Ряд из них показал значительно более высокий уровень цитотоксичности, чем исходный вариант пептида. Полученные результаты позволили предположить, что исследуемые пептиды вызывают клеточную гибель благодаря своей активности в качестве (слабых и слабоспецифичных) дисульфид оксидоредуктаз. Нами было показано, что подобные пептиды участвуют в обменной реакции дисульфид-дителиол и таким образом приводят к возникновению ненативных дисульфидных мостиков в клеточных белках. В свою очередь, это приводит к частичной потере белковой функции и стремительному наступлению апоптоза. В случае клеточной культуры HepG2 нам удалось идентифицировать одну из мишеней GO-подобных пептидов, а именно актин цитоскелета.

II. Дрожжевой белок Sup35p способен принимать прионную форму, которая активно изучается в качестве модели для прионных заболеваний в высших организмах. В частности, амилоидогенный участок этого белка, Sup35NM, послужил предметом многочисленных исследований. Один из вопросов, который до настоящего времени не получил окончательного разрешения, касается статуса M-домена в составе Sup35NM: является ли этот сегмент составной частью достаточно хорошо структурированных фибрилл или же, напротив, представляет из себя разупорядоченный участок последовательности. Такого рода вопрос можно решить с помощью двумерного эксперимента ЯМР (HSQC) в условиях быстрого вращения под магическим углом.



Однако используемые в экспериментах ЯМР образцы фибрилл фактически находятся в состоянии динамического равновесия с медленным обменом между фибриллами как таковыми и свободными мономерами (или олигомерами низкого порядка). Разделение спектральных сигналов от этих двух состояний представляет из себя серьезную проблему. Нам удалось решить эту проблему путём использования в импульсной последовательности ЯМР специального диффузионного фильтра, основанного на применении импульсных градиентов. Таким образом мы сумели получить спектры, содержащие исключительно сигналы от подвижных участков фибрилл. При этом нами был проведен детальный теоретический анализ трансляционной и вращательной диффузии фибрилл и опровергнуты недавно появившиеся в литературе данные, предполагающие, что подобное разделение сигналов невозможно. Измерения, проведенные на образце Sup35NM селективно обогащённом изотопом ^{15}N в аминокислотных остатках валина привели нас к заключению о том, что М домен на большей части своего протяжения является структурно разупорядоченным.

III. За последние 5 лет прогресс в области компьютерного моделирования позволил успешно свернуть ряд небольших белков *in silico*. Однако в настоящее время не существует методологии для моделирования окислительного фолдинга белков, т.е. фолдинга, сопровождающегося образованием дисульфидных связей. В своей работе мы постарались восполнить этот недостаток и разработали простой эмпирический алгоритм, позволяющий успешно моделировать окислительный фолдинг. Новый алгоритм был опробован на пептиде гуанилин, последовательность которого включает в себя 4 цистеина. Результаты нашего моделирования позволили полу-количественно воспроизвести распределение по изомерам, ранее наблюдавшееся в эксперименте. Сделанные нами оценки энергии привели нас к заключению о том, что окислительный фолдинг гуанилина протекает под кинетическим контролем. При этом была получена высококачественная структурная модель гуанилина, которая по нашему заключению превосходит неудачную экспериментальную структуру, полученную для укороченного варианта пептида. Помимо этого, нам также удалось успешно воспроизвести фолдинг гуанилина в составе прогормона прогуанилин с длиной последовательности в 94 аминокислотных остатка.

IV. Анализ банка данных Protein Data Bank позволил нам выявить прежде не описанный структурный мотив – а именно, взаимодействие группы NH_3^+ в боковой цепи лизина с карбонилем основной цепи. Новое взаимодействие характеризуется линейным расположением атомов, при котором атом О карбонильной группы находится на оси симметрии группы NH_3^+ (угол $\text{C}^{\text{e}}\text{-N}^{\zeta}\text{-O}$ около 180°). Как правило, это линейное взаимодействие встречается в сочетании с тремя стандартными водородными связями, образуемыми NH_3^+ (угол $\text{C}^{\text{e}}\text{-N}^{\zeta}$ -акцептор около 109°). Прделанные методом DFT вычисления для молекулярных моделей в полярной среде (PCM) позволили нам оценить энергию обнаруженного взаимодействия, которая, как оказалось, составляет примерно половину от энергии водородной связи. Интересно отметить, что в контексте белковой структуры линейное взаимодействие часто играет



значительную роль в кэппировании α -спиралей и 3_{10} -спиралей. Отметим, что линейное взаимодействие NH_3^+ - карбонил представляет из себя интересный пример ион-дипольных взаимодействий в белковых структурах, которые, в отличие от ион-ионных и диполь-дипольных взаимодействий (солевые мостики и водородные связи, соответственно), остаются по сей день практически неизученными.

Все исследования поддержаны грантом Российского научного фонда (проект №15-14-20038).



FXR1 – функциональный амилоид в мозге крысы

Rattus norvegicus.

Сопова Ю.В.^{1,2}, Велижанина М.Е.¹, Сергеева А.В.¹, Чиринская А.В.¹,
Синюкова В.А.¹, Шенфельд А.А.^{1,2}, Кошель Е.И.¹, Рыжова Т.А.^{1,2}, Волков
К.В.¹, Задорский С.П.^{1,2}, Галкин А.П.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет,

² Санкт-Петербургский филиал института общей генетики РАН

Амилоиды представляют собой фибриллярные белковые агрегаты, которые формируются за счет образования упорядоченных межмолекулярных бета-складчатых структур. Первые работы по изучению амилоидов были связаны с их патологической ролью в организме человека и млекопитающих. Кроме патологических амилоидов, известны белки, выполняющие свою функцию в амилоидной конформации – функциональные амилоиды.

В нашей лаборатории впервые разработан универсальный метод идентификации амилоидов в масштабах протеома – PSIA-LC-MALDI, позволяющий выявлять белки, обладающие амилоидными свойствами, в любых органах и тканях различных организмов. Этот метод основан на универсальном свойстве амилоидных фибрилл – их уникальной устойчивости к обработке ионными детергентами, такими как додецилсульфат натрия (SDS).

С помощью PSIA-LC-MALDI мы выявили ряд потенциально амилоидогенных белков, формирующих высокомолекулярные SDS-устойчивые агрегаты в мозге молодых самцов крысы *Rattus norvegicus*. Среди этих белков наибольший интерес вызывает FXR1, контролирующий долговременную память и эмоциональное состояние. FXR1 - консервативный белок, регулирующий транспорт и трансляцию некоторых мРНК в различных типах клеток млекопитающих.

Используя антитела, специфичные к FXR1, мы подтвердили, что этот белок представлен в мозге крысы в виде нерастворимых высокомолекулярных агрегатов, устойчивых к обработке SDS. Иммуногистохимический анализ срезов мозга крысы выявил присутствие агрегатов белка FXR1, окрашивающихся тиофлавином. Более того, мы показали, что амилоидные конформеры FXR1 в цитоплазме пирамидных нейронов связывают молекулы РНК и предохраняют их от деградации.

Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности FXR1 выявил потенциально амилоидогенный участок в N-терминальном фрагменте (1-380 а.к.) и отсутствие таковых в С-концевом фрагменте (380-568 а.к.). Флуоресцентная микроскопия клеток дрожжей *S. cerevisiae*, продуцирующих эти фрагменты, слитые с YFP, показала способность белка FXR1(1-380)-YFP к агрегации в клетках дрожжей и отсутствие агрегации гетерологичного белка FXR1(380-568)-YFP.



Амилоидные свойства белка FXR1(1-380) были также охарактеризованы с помощью бактериальной системы C-DAG. Эта система позволяет идентифицировать гетерологичные белки, способные формировать амилоидные фибриллы *in vivo* при продукции в клетках *E. coli* и экскреции в межклеточное пространство. Мы показали, что белок FXR1(1-380) при продукции в системе C-DAG формирует фибриллы, которые связываются с амилоид-специфичным красителем «Конго красный» и демонстрируют двойное лучепреломление.

Таким образом, выявлен функциональный амилоид в мозге млекопитающих. Впервые показано, что белок может функционировать в мозге млекопитающих в виде фибрилл, связывающих в физиологических условиях амилоид-специфичный краситель.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-50-00069. Для выполнения исследований использовалась приборная база ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС» и «МиКТ» научного парка СПбГУ.



**Фундаментальные и прикладные аспекты исследований
плюрипотентных стволовых клеток**

Томилин А.Н.

*Институт трансляционной биомедицины СПбГУ,
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*
e-mail: a.tomilin@incras.ru

Плюрипотентные стволовые клетки, которым будет посвящен доклад, выдвинулись на передний край клеточной биологии и, возможно, всей биомедицины в связи с широчайшими возможностями применения этих клеток для моделирования заболеваний и тканезаместительной терапии у человека. Уникальной особенностью этих клеток является способность к самоподдержанию и дифференцировки во все клеточные типы тканей взрослого организма (за исключением двух внезародышевых клеточных типов – трофэктодермы и первичной эндодермы). В докладе будет освещена история развития данного направления биологии, приведены результаты современных достижений в области плюрипотентных стволовых клеток. Заметная доля этих исследований посвящена центральному регулятору клеточной плюрипотентности, POU-доменному белку Oct4, необходимому как для поддержания, так и для индукции клеточной плюрипотентности. В докладе будет затронута важная тема, касающаяся приложения фундаментальных знаний о плюрипотентных стволовых клетках в практической медицине. Проекты, представленные в докладе, были поддержаны грантами РФФИ №14-50-00068 и 17-14-01407.



Фосфоресцентные комплексы переходных металлов в биоимиджинге, или перспективы взаимодействия медиков с химиками и физиками.

Туник С. П.

Санкт-Петербургский Государственный университет, Институт Химии
sergey.tunik@spbu.ru, <http://tmc-lab.chem.spbu.ru/>

Использование красителей в люминесцентной микроскопии насчитывает более чем столетнюю историю и стало одним из основных инструментов современного биоимиджинга, который используется не только для изучения структуры исследуемых биологических образцов, но и для определения их физиологического статуса в норме и при патологических изменениях. Необходимо отметить, что до последнего времени основным типом применяемых в имиджинге красителей были органические соединения, которые являются синглетными люминофорами с характерными эмиссионными характеристиками, определяемыми синглетной природой возбужденного состояния. Однако в последнее десятилетие все большее применение получают красители на основе комплексов переходных металлов, которые являются триплетными эмиттерами и обладают уникальными фотофизическими характеристиками (большой Стоксовский сдвиг, времена жизни в микро- и миллисекундном диапазоне, чувствительность параметров эмиссии к присутствию молекулярного кислорода, изменениям температуры и других физиологических параметров). Эти свойства позволяют существенно расширить возможности люминесцентной микроскопии для исследования структуры и физиологического состояния клеток и тканей, в том числе и с применением времязрешенных методик, таких как Phosphorescence Lifetime Imaging (PLIM). Эффективное использование этого, как впрочем, и любого другого класса красителей в имиджинге определяется рядом специфических характеристик, таких как растворимость и устойчивость в физиологических средах, возбуждение и эмиссия в оптическом диапазоне близком или совпадающем с окном прозрачности биологических тканей, максимальный отклик на изменение измеряемых параметров среды (концентрация кислорода, pH, температура). Поэтому развитие синтетической химии направленной на создание соединений с заданными оптическими и физико-химическими свойствами в настоящее время является актуальной задачей координационной химии, во многом определяющей прогресс в этой области исследований.

В настоящем сообщении будут показаны основные особенности биоимиджинга с помощью комплексов переходных металлов и продемонстрированы основные подходы к синтезу новых классов люминофоров, предназначенных для использования в современной люминесцентной микроскопии.



Таргетное секвенирование у российских семей с аритмогенной кардиомиопатией.

М.А. Федяков¹, О.Е. Велеславова², С.В. Апалько^{1,4}, О.В. Романова¹, Н.Ю. Швед^{1,4,6}, Полякова И.В.¹, Пакин В.С.⁶, О.С. Глотов^{1,4,6}

¹СПб ГБУЗ «Городская больница № 40», Санкт-Петербург, Россия

²Научно-клинический и образовательный центр «Кардиология», Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³кафедра последипломного медицинского образования Медицинского факультета СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

⁴Лаборатория геномных и протеомных исследований Института трансляционной биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

⁵Military Medical Academy named after S.M.Kirov, Saint-Petersburg, Russia

⁶Лаборатория пренатальной диагностики ФГБНУ "НИИ АГуР им. Отта", Санкт-Петербург, Россия

Введение. Аритмогенная кардиомиопатия – наследственное прогрессирующее заболевание сердечной мышцы, проявляющееся жировой дистрофией миокарда и злокачественными желудочковыми аритмиями. Преимущественно поражается миокард правого желудочка. Одним из первых симптомов может явиться внезапная сердечная смерть. Своевременная постановка диагноза позволяет избежать развития жизнеугрожающих осложнений, дать прогноз здоровья больным и их родственникам. Генетическое тестирование является необходимой частью исследования больного с подозрением на аритмогенную кардиомиопатию.

Материалы и методы. В исследование вошло 13 семей больных с достоверным или вероятным диагнозом аритмогенная кардиомиопатия (АК), а также их родственники (всего 43 человека). Диагноз устанавливался в соответствии критериями рабочей группы Европейского общества кардиологов (Task Force Criteria 2010). Методом высокопроизводительного (NGS) секвенирования на приборе MiSeq (Illumina) был проведен анализ кодирующих регионов 46 генов, ассоциированных с развитием наследственных кардиомиопатий (в т.ч. 10 генов, ответственных за развитие АК - *PKP2*, *PLN*, *DSP*, *DSC2*, *DSG2*, *JUP*, *TMEM43*, *DES*, *TTN*, *LMNA*). Выявленные варианты, классифицированные как патогенные, далее подтверждались с помощью секвенирования по Сенгеру.

Результаты. По результатам первичного анализа данных была выявлена новая фреймшифт-мутация с.355delT в гене *PKP2*. Носители данной мутации – пациент с достоверным диагнозом АК и трое его детей (бессимптомные на данный момент). В остальных семьях выявлены варианты неясной клинической значимости, либо результаты теста оказались отрицательными.



Заключение. Клиническая чувствительность метода в исследуемой группе составила менее 10%, что существенно меньше, чем в литературных данных. Тем не менее, данных о российской популяции пациентов с АК недостаточно, что может говорить о ее отличии от таковых в мире. Найдена новая патогенная мутация в семье с АК. В данной семье все дети унаследовали патогенную мутацию отца, что говорит о наличии у них высокого риска развития АК и ВСС. В соответствии с этим приняты профилактические меры (регулярное кардиологическое обследование, изменение образа жизни), позволяющие избежать как развития самого заболевания, так и связанных с ним осложнений. В настоящее время разработан дизайн собственной диагностической панели для дальнейших исследований российской популяции пациентов с АК и другими формами наследственных заболеваний сердца (наследственные кардиомиопатии, наследственные каналопатии, наследственные дислиппротеинемии).



Получение нейроэпителиальных стволовых клеток и 3D-органOIDов с помощью дифференцировки индуцированных плюрипотентных клеток человека

М. Черепкова^{1,2}, Э. Пёрсти¹, Ш. Абдурахманова¹, П. Пиеппонен¹, Р. Гайнетдинов², Т. Отонкоски¹, М. Беспалов¹

¹ *Biomedicum Stem Cell Center, Research Programs Unit, Molecular Neurology, University of Helsinki, Finland*

² *Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии, Институт Трансляционной Биомедицины СПбГУ*

Мы оптимизировали протокол получения нейроэпителиальных стволовых клеток (NESC) из плюрипотентных стволовых клеток человека. Человеческие NESc способны к самообновлению на протяжении более 40 пассажей и дифференцировке в нейроны, астроциты и предшественники олигодендроцитов. Основываясь на высоком уровне экспрессии Pax6, Sox1, Sox2, Olig2, HoxA2, HoxB4 и низкой экспрессии Pax3, эти клетки специфичны для центральной нервной системы и имеют вентрокаудальную региональную идентичность.

Помимо дифференцировки в адгезивной культуре, NESc способны к дифференцировке в 3D, формируя так называемые церебральные органOIDы («cerebral organoids»), содержащие зрелые и функциональные нейроны, глиальные клетки и структуры, напоминающие развивающуюся кору головного мозга с характерными складками. Незрелые органOIDы содержат зоны нейрональных предшественников, характеризующиеся экспрессией генов Sox2, DCX и Olig2. После культивирования в течение двух месяцев мы могли детектировать различные типы нейронов, включая ГАМК-, дофаминергические, серотонинергические, а также астроциты. Дополнительная регионализация органOIDов с помощью активации FGF8 и SHH-сигнальных путей приводит к значительному увеличению количества TH-положительных клеток и возможности детекции дофамина в среде культивирования.

Данный протокол может быть использован для более эффективного получения NESc, способных к дифференцировке в нейрональные клетки как в монослое, так и в 3D-культуре и может стать основой для создания платформы для моделирования заболеваний ЦНС человека.



Использование CRISPRa в репрограммировании клеток

М. Черепкова,^{1,2} Э. Пёрсти¹, Д. Балбоа¹, Е. Велтнер¹, Р. Гайнетдинов², М. Беспалов¹, Т. Отонкоски¹

¹*Biomedicum Stem Cell Center, Research Programs Unit, Molecular Neurology,
University of Helsinki, Finland*

²*Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии,
Институт Трансляционной Биомедицины СПбГУ*

Клеточное репрограммирование – это процесс изменения клеточной идентичности посредством изменения начальной транскрипционной программы. На сегодняшний день была показана возможность репрограммирования терминально дифференцированных соматических клеток обратно в стволовые клетки или прямой конверсии одного типа клеток в другой. Идентификация факторов репрограммирования – генов, модуляция экспрессии которых может способствовать индукции конверсии, является важной задачей, решение которой для дальнейшего развития этой технологии и понимания механизмов дифференцировки клеток.

Транскрипционный фактор OCT4 играет важную роль в раннем эмбриональном развитии и установлении и регуляции плюрипотентности. Уровень мРНК OCT4 снижается при оплодотворении, тогда как зиготическая активация экспрессии OCT4 происходит только на стадии морулы. Механизмы активации OCT4 в эмбриональном развитии человека мало изучены, и идентификация новых регуляторов OCT4 важна для понимания механизмов установления плюрипотентности во время эмбрионального развития. Кроме того, данные регуляторы могут быть использованы в качестве факторов репрограммирования при получении индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (иПСК).

Мы провели полногеномный скрининг для идентификации новых регуляторов эндогенной экспрессии OCT4 с использованием трансактивационной системы CRISPR/dCas9. Каталитически неактивная эндонуклеаза dCas9 может быть использована в качестве модулятора экспрессии генов посредством добавления доменов, служащих как активаторы или репрессоры транскрипции. Мы показали, что использование химерного белка, полученного при слиянии dCas9 с 12 повторами трансактивационного домена VP16 (dCas9VP192) может эффективно активировать эндогенную экспрессию OCT4 при использовании РНК-гидов связывающихся с промотером гена.

Также мы обнаружили, что эндогенная активация экспрессии OCT4 в нейроэпителиальных стволовых клетках человека (hNESc) способствует



репрограммированию этих клеток в iPСК. Отсутствие экспрессии OCT4 и высокая эффективность репрограммирования делают hNESC идеальной скрининговой платформой для обнаружения новых генов, которые могут активировать эндогенную экспрессию OCT4.

Мы использовали полногеномную лентивирусную библиотеку РНК-гидов, связывающихся с промотерными областями всех кодирующих изоформ человеческого генома. С помощью репортерной линии hNESC-Oct4-GFP-Puro мы могли детектировать активацию экспрессии OCT4 и формирование колоний, устойчивых к пурамицину, однако мы не наблюдали полного репрограммирования в результате скрининга. Среди генов, РНК-гиды которых были интегрированы в геном клеток, мы обнаружили OCT4 и для ZSCAN4 - известные регуляторы экспрессии OCT4, а также новые гены-кандидаты. Обнаруженные гены-кандидаты будут протестированы в репрограммировании первичных фибробластов человека.



Библиотека Матлаб для аппроксимации сигналов в двумерных ЯМР спектрах.

Шабан Али, Рабдано Севастьян

Лаборатория био-ЯМР СПбГУ, Санкт-Петербург 199034

Физический факультет СПбГУ, Санкт-Петербург 199034

E-mail: shaban-a@live.com

ЯМР-спектроскопия является мощным инструментом научных исследований. Она помогает получить информации об исследуемом материале на молекулярном и атомном уровнях без разрушения образца. Полученные данные ЯМР могут быть проанализированы с использованием различных программных пакетов для характеристики важных молекулярных свойств образца. Следует, однако, отметить, что многие из этих пакетов написаны на специализированных языках программирования, которые ограничивают пользователя при решении новых и нестандартных задач. С другой стороны, Matlab - популярная цифровая вычислительная среда, которая создаёт условия для эффективного решения широкого круга задач. Иллюстрация потенциала для использования среды Matlab при обработке 2D ЯМР спектров является мотивацией этой работы.

«2D NMR spectra fitter» - это программа, которая позволяет исследователям аппроксимировать 2D-спектры и извлекать их параметры, такие как ширина пика. После получения сигнала ЯМР преобразование Фурье дает нам спектр, состоящий из пиков с лоренцевой формой линии. Наша программа использует в качестве входных два файла: спектральные данные и таблицу пиков. В качестве выхода программа генерирует таблицу с параметрами обработанных пиков. При анализе пиков мы подразделяем сигналы на кластеры; каждый кластер содержит расположенные поблизости друг от друга (частично перекрывающиеся) пики. Каждый кластер аппроксимируется в программе как суперпозиция нескольких пиков с определённой формой линии. Для каждого пика определяется его положение (химические сдвиги), ширины линий, и соответствующие погрешности. Программа была успешно апробирована при обработке серии экспериментов с импульсными градиентами записанными на образце домена RRM2 белка TDP-43. Полученные объемы спектральных пиков были использованы для определения коэффициента диффузии и молекулярной массы диффундирующих частиц, а именно мономеров и агрегатов RRM2. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (проект №15-14-20038).



Роль митохондрий в реорганизации синаптических проекций из черной субстанции в стриатум при болезни Паркинсона.

Шупляков О. В.

*Институт трансляционной медицины, СПбГУ, Россия;
Каролинский Институт, Стокгольм, Швеция*

Фактор транскрипции *Lmx b* играет важную роль в формировании дофаминергических нейронов мозга млекопитающих. Многие факторы транскрипции, которые участвуют в формировании и специализации нервных клеток в эмбриогенезе не синтезируются в зрелых нейронах. Долгое время было неясно почему *Lmx b* продуцируется дофаминергическими нейронами после дифференцировки. Исследования показали, что этот фактор транскрипции необходим для поддержания нормальной морфологии и функций этих нейронов. Выключение *Lmx b* приводит к реорганизации проекций нейронов черной субстанции и последующей гибели этих клеток. Важно отметить, что снижение синтеза *Lmx b* наблюдается у больных с диагнозом болезнь Паркинсона.

На начальных стадиях выключение *Lmx b* у взрослых мышей нервные окончания теряют связь с нейронами в стриатуме и образуют гигантские нервные окончания содержащие элементы аутофагасомной-лизосомной системы. Одним из компонентов присутствующим в терминалях являются аутофагасомы содержащие митохондрии. В наших экспериментах мы исследуем возможную роль митохондрий и белков, регулирующих их функции в реорганизации дофаминергических синаптических проекций. Для этого мы используем мышей, у которых гены контролирующие функции митохондрий могут быть селективно выключены в дофаминергических нейронах во взрослом состоянии. Эксперименты показывают, что нарушения функций этих генов приводят к нарушениям морфологии митохондрий, сокращению проекций нейронов в стриатуме и ранней гибели клеток черной субстанции. Однако, характерных пластических изменений нервных окончаний вызванных выключением *Lmx b* не наблюдается. Это предполагает дополнительное участие других механизмов при патологии дофаминергических нервных окончаний вызванной нарушениями функции *Lmx b*.