

Віо²⁰²³ ТОР

**Научная молодежная школа-конференция
ВіоТор 2023:
Достижения молодых ученых ИХБФМ
30 ноября — 1 декабря 2023 г.**



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ФОНД
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СО РАН

ВioTop-2023.
Достижения молодых ученых
ИХБФМ

Научная молодежная школа-конференция

Материалы конференции

НОВОСИБИРСК

2023

БиoTop-2023: Достижения молодых ученых ИХБФМ — Новосибирск, ИХБФМ СО РАН, 2023. — 73 с.

Материалы научной школы-конференции для молодых ученых, которая проходила с 30 ноября по 1 декабря 2023 года на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск) при поддержке Российского Научного Фонда (грант РНФ 19-74-30011).

Сборник предназначен для широкого круга студентов, аспирантов и молодых ученых различных биологических и смежных специальностей.

Программный комитет конференции:

Академик РАН, проф., д.х.н. Власов Валентин Викторович
*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск Россия*

Чл.-корр. РАН, проф., д.б.н. Зенкова Марина Аркадьевна
*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск Россия*

д.б.н. Черноловская Елена Леонидовна
*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск Россия*

д.б.н. Миронова Надежда Львовна
*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск Россия*

к.б.н. Логашенко Евгения Борисовна
*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск Россия*

к.б.н. Марков Олег Владимирович
*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск Россия*

к.х.н. Новопашина Дарья Сергеевна
*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск Россия*

к.х.н. Мызина Светлана Дмитриевна
*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск Россия*

к.х.н. Пестряков Павел Ефимович
*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск Россия*

Организационный комитет конференции:

Зуева Анна Игоревна
*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск Россия*

Кожевникова Ольга Владимировна
*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск Россия*

ПРОГРАММА МОЛОДЕЖНОЙ ШКОЛЫ-КОНФЕРЕНЦИИ

"BioTop-2023: Достижения молодых ученых ИХБФМ", посвященной 40-летию института.

30 ноября - 1 декабря 2023 г

30 ноября 2023 г.				
Сессия 1. Инструменты воздействия на клеточную трансформацию и канцерогенез				
Председатели: д.б.н., чл-корр. РАН М.А. Зенкова, к.х.н. Кутузов М.М.				
9-30 - 9-40	В.В. Власов М.А. Зенкова	Открытие школы-конференции молодых ученых ИХБФМ СО РАН Bio-Top-23		
9-40 – 10-05	Г.А. Степанов	Модификации мРНК и мРНК-технологии: о чем Нобелевская премия 2023?	ЛГР	лекция
10-05 – 10-20	Аулова Ксения Сергеевна	Каталитическая активность антител и изменение различных параметров спонтанного и индуцированного иммунизацией экспериментального энцефаломиелита у трансгенных мышей 2D2 и Th	ЛФР	
10-20 – 10-35	Абдурахманова Мария Маджидовна	Трансформация фенотипа НК-клеток в составе 3D- модели РМЖ при стимуляции IL-15 или TGFβ	ЛБТХ	асп.
10-35 - 10-45	Awad Mona	The importance of studying and generating myeloid derived suppressor cells	ЛНГК	асп
10-45 – 11-00	Золотенкова Елизавета Алексеевна	Роль гидроксирования рибосомных белков в регуляции экспрессии генов	ЛСФР	асп
11-00 - 11-15	Чиглинцева Дарья Александровна	Крабоподобные искусственные рибонуклеазы для разрушения миРНК в функционально значимых областях и подавления процессов канцерогенеза	ЛБНК	асп
11-15 – 11-30	Чернышова Ирина Алексеевна	Липофильный пуриновый нуклеозид-ингибитор Tdp1 - эффективный сенсibilизатор топотекана in vitro и in vivo	ЛБХФ	асп

Научная молодежная школа-конференция «BioTop-2023. Достижения молодых ученых ИХБФМ» 30 ноября - 1 декабря 2023, г.
Новосибирск, Россия

11-30 – 11-50	Перерыв на кофе			
11-50 – 12-05	Моралев Арсений Денисович	Поиск маркеров множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток и разработка низкомолекулярных ингибиторов данного фенотипа.	ЛБНК	магист.
12-05 – 12-15	Голосова Наталия Николаевна	Получение и изучение активности эндолизина термофильного бактериофага AegIP46	ЛММ	магист.
12-15 – 12-25	Кичкина Дарья Олеговна	Новые производные изоалантолактона как противоопухолевые кандидаты: акцент на рак молочной железы и мультиформную глиобластому	ЛБНК	магист.
12-25 – 12-40	Рябова Елена Сергеевна	Биопленки бактерий: визуализация, строение, эффект антибактериальных препаратов	ГМИ	асп.
12-40 – 13-15	Одаренко Кирилл Вячеславович	Эпителиально-мезенхимальный переход как связующее звено между воспалением и прогрессией рака легкого	ЛБНК	лекция
13-25 – 14-25	ПЕРЕРЫВ НА ОБЕД			
Сессия 2. От молекулярной биологии к фундаментальной медицине Председатели: д.б.н. Н.В. Тикунова и к.б.н. Е.Б. Логашенко				
14-30 – 15-05	Марков Олег Владимирович	Опухоль-индуцированная иммуносупрессия — механизмы и методы коррекции	ЛБНК	лекция
15-05 – 15-20	Агеенко Алиса Борисовна	Онколитический вирус VV-GMCSF-Lact в комбинированной химиотерапии глиом	ЛБТХ	асп.
15-20 – 15-35	Журавлев Евгений Сергеевич	Функциональный анализ малых ядрышковых РНК в клетках аденокарциномы легких человека A549 в условиях заражения вирусом гриппа А	ЛГР	
15-35 – 15-45	Сунбули Хетам	Isolation and functional analysis of murine splenic neutrophils	ЛБНК	асп.

Научная молодежная школа-конференция «BioTop-2023. Достижения молодых ученых ИХБФМ» 30 ноября - 1 декабря 2023, г.
Новосибирск, Россия

15-45 – 16-00	Талышев Вадим Алексеевич	Получение и характеристика радиорезистентных вариантов клеток линии HeLa	ЛБНК	асп.
16-00 – 16-30	Перерыв на кофе			
16-30 – 16-45	Филатова Алина Алексеевна	Изменение профиля экспрессии нормальных и трансформированных клеток в ответ на присутствие внеклеточной ДНК	ЛБНК	асп.
16-45 – 16-55	Федорец Валерия Александровна	Трансплантация кишечной микробиоты при лечении пациентов с язвенным колитом: изменения микробиома и клинические результаты	ЛММ	магист.
16-55 – 17-10	Короленя Валерия Александровна	Молекулярно-генетические аспекты варикозной болезни нижних конечностей	ЛФГ	асп.
Сессия 3. Диагностика заболеваний на молекулярном уровне Председатели: д.б.н. Н.Л. Миронова и д.б.н. В.Н. Бунева				
17-10 – 17-45	Кечин Андрей Андреевич	Диагностика мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 и дефицита гомологичной рекомбинации (HRD) для назначения ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP)	ЛФГ	лекция
17-45 – 18-00	Меламуд Марк Маркович	Повышенный уровень циркулирующей внеклеточной ДНК как маркер суицидальных попыток в анамнезе пациентов с шизофренией	ЛФР	асп.
18-00 – 18-25	Перерыв на кофе			
18-25 – 18-40	Джугашвили Екатерина Игоревна	Определение уровня опухоли-ассоциированных miR-24 и miR-101 в составе экзосом плазмы крови и асцитической жидкости у больных с раком яичников	ЛММ	студ
18-40 – 18-50	Сайткулова Милена Максимовна	Внеклеточные микроРНК мочи как маркеры кастрационной резистентности при раке предстательной железы	ЛММ	студ

Научная молодежная школа-конференция «BioTop-2023. Достижения молодых ученых ИХБФМ» 30 ноября - 1 декабря 2023, г.
Новосибирск, Россия

18-50 – 19-00	Шутко Екатерина Викторовна	Влияние терапии рака предстательной железы на динамику уровня микроРНК в составе внеклеточных везикул мочи	ЛММ	магистр.
19-00 – 19-10	Шефер Алексей Александрович	Идентификация белков экзосом, вовлеченных в прогрессирование карциномы молочной железы	ЛММ	магистр.
1 декабря 2023 г.				
Сессия 4. Регуляция клеточных систем редактирования для контроля над патологическими состояниями Председатели: к.б.н. Е. Белоусова и к.б.н. А.В. Марков				
9-30 – 10-05	Кутузов Михаил Михайлович	Нуклеосома как барьер для репарации ДНК	ЛБХФ	лекция
10-05 – 10-20	Шатунова Елизавета Андреевна	Создание колориметрических систем детекции белка DKK-1 на основе аптамеров	ЛХРНК	-
10-20 – 10-35	Украинцев Александр Андреевич	Влияние поли(ADP-рибоза)полимераз 1,2 и 3 на структуру нуклеосом	ЛБХФ	асп.
10-35 – 10-50	Матвеева Анастасия Михайловна	Характеризация компактной термостабильной эндонуклеазы Cas9 из <i>Anoxybacillus flavithermus</i>	ЛГР	-
10-50 – 11-05	Прохорова Дарья Вадимовна	Влияние природных модифицированных нуклеотидов в направляющих РНК на систему CRISPR/Cas9	ЛГР	-
11-05 – 11-15	Ковешникова Анастасия	Особенности селективности и специфичности узнавания и расщепления целевой двуцепочечной ДНК эндонуклеазой Cas9	Центр масс-спектр. ан	бакалавр
11-15 – 11-25	Мелентьев Василий Сергеевич	Новые ингибиторы 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека как регуляторы воспалительного ответа	ЛГБИ	-
11-25 – 11-50	Перерыв на кофе			
11-50 – 12-05	Ван Мэйлин	Разработка тераностических конъюгатов на основе альбумина для сочетания химиотерапии с бор-	ЛОРС	асп

Научная молодежная школа-конференция «BioTop-2023. Достижения молодых ученых ИХБФМ» 30 ноября - 1 декабря 2023, г. Новосибирск, Россия

		нейтронозахватной терапией		
12-05 – 12-20	Митин Дмитрий Евгеньевич	Конъюгаты альбумина как мультимодальные контрастные агенты для магнитно-резонансной и флуоресцентной томографии	ЛБХ	магистр
12-20 – 12-35	Олейник Галина Александровна	Структуры олигомерных форм двух лед-связывающих белков, образующиеся при взаимодействии со льдом	Центр масс-спектр.	асп
12-35 – 12-45	Новикова Татьяна Сергеевна	Гидролиз олигодезоксирибонуклеотидов на поверхности ДНК-микрочипов и в растворе каталитическими анти-ДНК-антителами при системной красной волчанке	ЛФР	магистр
12-45 – 13-00	Урусов Андрей Евгеньевич	Разнообразие каталитических активностей антител крови мышей C57BL/6 при развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита	ЛФР	асп
13-00 – 13-15	Булгакова Анастасия Евгеньевна	Влияние фосфорилгуанидиновой модификации в праймерах на процессивность Taq-полимеразы	ЛСБ	асп
13-15 – 14-25	ПЕРЕРЫВ НА ОБЕД			
Сессия 5. Противоопухолевые препараты: от низкомолекулярных веществ до терапевтических нуклеиновых кислот.				
Председатели: д.б.н. Е.Л. Черноловская и к.м.н. И.А. Савин				
14-25 – 15-00	Савин Иннокентий Андреевич	Легочный фиброз как результат острого воспаления: молекулярные механизмы, прогностические маркеры и терапевтические мишени	ЛБНК	лекция
15-00 – 15-10	Бачкова Ирина Калиновна	Разработка паттерна мезильных модификаций для малых интерферирующих РНК	ЛБНК	магистр
15-10 – 15-25	Корниенко Татьяна Евгеньевна	Производное усниновой кислоты усиливает противоопухолевое и антиметастатическое действия	ЛБХФ	асп

Научная молодежная школа-конференция «BioTop-2023. Достижения молодых ученых ИХБФМ» 30 ноября - 1 декабря 2023, г.
Новосибирск, Россия

		топотекана в отношении карциномы легкого Льюис in vivo		
15-25 – 15-40	Ощепкова Анастасия Леонидовна	Искусственные внеклеточные везикулы как средства доставки терапевтических нуклеиновых кислот	ЛБНК	-
15-40 – 15-55	Попова Виктория Константиновна	Нанокompозитные материалы на основе карбоната кальция для улучшенной фармакокинетики терапевтических средств	ЛБМХ	асп
15-55 – 16-05	Канарская Мария Антоновна	Разнообразие самособирающихся комплексов РНК: от наноархитектуры до наномашин	ЛСТБ	магистр
16-05 – 16-30	Перерыв на кофе			
Сессия 6. Производные олигонуклеотидов для биомедицинских применений Председатели: д.б.н. В.Н. Сильников и к.х.н. М.А. Воробьева,				
16-30 – 16-45	Жуков Сергей Артемович	Методы синтеза фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидных производных	ЛХНК	асп
16-45 – 17-00	Жарков Тимофей Дмитриевич	Разработка новых гибких подходов к получению триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов	ЛХНК	асп
17-00 – 17-15	Новгородцева Алина Игоревна	Нуклеотиды с α -фосфатными модификациями: синтез и применение	ЛСТБ	асп
17-15 – 17-30	Барановская Елизавета Евгеньевна	Эффективная ПЦР диагностика с новыми фосфорамидными азольными олигонуклеотидами (ФАО)	ЛСТБ	асп
17-30 – 17-40	Пушкаревская Анна Анатольевна	Влияние нуклеотидного контекста на термодинамические и флуоресцентные свойства ДНК дуплексов, содержащих флуоресцентную модификацию, введенную по гетероциклическому основанию	ЛСТБ	магистр
17-40 – 17-50	Юшин Иван Игоревич	Использование методов молекулярной динамики для прогнозирования структуры и термодинамических	ЛСТБ	студ.

Научная молодежная школа-конференция «BioTop-2023. Достижения молодых ученых ИХБФМ» 30 ноября - 1 декабря 2023, г.
Новосибирск, Россия

		параметров нативных и модифицированных по рибозофосфатному остову олигонуклеотидов		
17-50 – 18-00	Курочкин Тихон Николаевич	Создание флуоресцентно-меченых нитрозилированных форм человеческого сывроточного альбумина путем транснаитрозилирования с помощью S-нитрозоглутатиона	ЛОРС	студ
18-00 – 18-20	Перерыв на кофе			
18-20 – 18-30	Седельникова Анастасия Юрьевна	Гибридные молекулярно-импринтированные полимеры для биомедицинских применений	ЛБМХ	студ
18-30 – 18-45	Задворных Данила Андреевич	Синтез и исследование антибактериальной активности производных DAVCO с карвакролом	ЛОРС	асп
18-45 – 19-00	Григорьева Евгения Владимировна	Белковые наночастицы: новый подход к синтезу и исследование свойств	ЛБМХ	асп
19-00 – 19-15	Рогалева Валерия Игоревна	Новые борсодержащие соединения для тераностики злокачественных опухолей	ЛОРС	асп
19-15 – 19-20	Заккрытие конференции			

**Инструменты воздействия
на клеточную трансформацию и канцерогенез**

Модификации мРНК и мРНК-технологии: исследования на переднем крае науки

Антропов Д.Н.¹, Марков О.В.¹, Дюма А.С.¹, Гладких Д.В.¹, Матвеева А.М.¹, Журавлев Е.С.¹, Голышев В.М.¹, Пучков П.А.², Макарова Д.М.², Маслов М.А.², Степанов Г.А.^{1*}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия*

В настоящее время происходит активное развитие направления по созданию терапевтических агентов и вакцин на основе мРНК. Главный вопрос звучит очень просто «Как РНК превратить в лекарство?». Еще в 2005 году Каталин Карико и Дрю Вайсманом показали, что модификации, включенные в состав искусственных РНК, позволяют практически полностью устранить нежелательные эффекты действия РНК на клетку. Во время пандемии новой коронавирусной инфекции именно мРНК-вакцины помогли остановить распространение инфекции. Сейчас начинается новая эра мРНК-вакцин против инфекционных заболеваний, персонализированных противораковых мРНК-вакцин и мРНК-терапии.

Одним из направлений исследования по преодолению барьеров перехода в практику в мРНК-технологиях является повышение эффективности доставки препаратов на основе РНК *in vivo* и *in vitro*. В своем исследовании мы разработали стратегию синтеза функциональных мРНК. В первую очередь, нами были получены мРНК репортерных генов, а именно, зеленого флуоресцентного белка (GFP), красного флуоресцентного белка mKate2 и люциферазы светлячка (FLuc). Полученные искусственные мРНК содержали модификации в виде псевдоуридина и 5'-кэпов, а также последовательности UTR, фланкирующие рамку считывания с 5'- и 3'-конца. Реализованная схема синтеза мРНК включала также стадии обработки фосфатазой и ферментативного полиаденилирования. Было показано, что при трансфекции мРНК GFP и mKate2 в концентрации 0,5-8,0 мкг/мл удается детектировать флуоресценцию в клетках человека. Функциональность мРНК FLuc была подтверждена при трансфекции с последующим лизисом клеток через 24 ч и проведением стандартной люциферин-люциферазной реакции. С использованием полученных репортерных мРНК мы проводили скрининг липосом на основе поликатионных амфифилов 2X3 и 2X7 и липида-хэлпера DOPE по эффективности доставки искусственных мРНК в клетки человека. Было показано, что изучаемые липосомы демонстрируют необычную кинетику доставки мРНК *in vivo* и *in vitro* с «отложенным стартом» и продолжительным сохранением сигнала репортерного гена.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-75-10153.

Каталитическая активность антител и изменение различных параметров спонтанного и индуцированного иммунизацией экспериментального энцефаломиелимита у трансгенных мышей 2D2 и Th

Аулова К. С., Невинский Г. А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Для исследования процессов при рассеянном склерозе человека используют моделирование на животных, в том числе на ряде линий мышей. Классическим вариантом является экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ), индуцированный иммунизацией мышей C57BL/6 пептидом миелин-олигодендроцитарного гликопротеина МОГ³⁵⁻⁵⁵. При рассеянном склерозе человека и при ЭАЭ мышей данной линии после иммунизации пептидом наблюдают инфильтрацию иммунных клеток в ЦНС, демиелинизацию и повреждение аксонов, повышение уровня антител крови к различным аутоантигенам, а также детектируют каталитическую активность антител крови в гидролизе различных субстратов, что указывает на протекание аутоиммунных процессов. Другим вариантом модели являются трансгенные линии мышей – например, 2D2 и Th со специфичными к МОГ рецепторами Т и В лимфоцитов соответственно. Мыши линии 2D2 предрасположены к спонтанному возникновению ЭАЭ, а у особой обеих линий после иммунизации с помощью МОГ³⁵⁻⁵⁵ развивается более тяжелое заболевание, чем у мышей линии C57BL/6, на генетической основе которой были созданы линии 2D2 и Th.

В данной работе анализировали изменения различных параметров экспериментального энцефаломиелимита с течением времени у самцов и самок трансгенных линий мышей 2D2 и Th как без иммунизации, так и после иммунизации энцефалитогенным пептидом МОГ³⁵⁻⁵⁵. Каталитические активности IgG крови в гидролизе ДНК, гистонов, основного белка миелина и пептида МОГ как у особой Th, так и у особой 2D2 в целом повышались со временем по сравнению с нулевой точкой эксперимента. Однако после иммунизации МОГ³⁵⁻⁵⁵ активности IgG резко увеличивались в начальную и острую фазу ЭАЭ, несмотря на менее выраженные изменения уровней антител крови к данным субстратам. Наиболее показательным было повышение ДНКазной активности антител у самцов и самок 2D2 после иммунизации – в 63 и 241 раз.

На мышинной модели системной красной волчанки ранее было показано, что наработка каталитических антител сопровождается изменениями в профиле дифференцировки гемопоэтических клеток костного мозга. Как до, так и после иммунизации особой линии 2D2, повышалось число колоний, образованных гранулоцитарно-макрофагальными и смешанными колониеобразующими единицами, в особенности у самцов. Показано, что со временем у мышей 2D2 и Th изменяется соотношение Т и В лимфоцитов в крови и различных органах, а также вес и количество белка в моче при спонтанном и индуцированном развитии ЭАЭ. Данные изменения, совместно с изменениями каталитических активностей IgG, указывают на сходства и отличия течения экспериментального энцефаломиелимита у трансгенных линий мышей с аутореактивными Т- и В-клетками.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 22-15-00103.

Трансформация фенотипа НК-клеток в составе 3D-модели РМЖ при стимуляции IL-15 или TGFβ

Абдурахманова М. М.¹, Леонтьева А. А.^{1,2}, Юрина А. А.^{2,3}, Беловежец Т. Н.³, Кулемзин С. В.³,
Кулигина Е. В.¹, Рихтер В. А.¹, Нуштаева А. А.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Россия

³ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

Рак молочной железы (РМЖ) – распространенное онкологическое заболевание среди женщин. Новые подходы для лечения РМЖ нацелены на усиление противоопухолевого иммунного ответа. Для оценки эффективности терапевтических подходов необходимы клеточные модели, максимально отражающие сложность опухоли.

Цель: оценить влияние IL-15 и TGFβ на трансформацию фенотипа первичных НК-клеток, полученных от здорового донора (PB-NK), в составе 3D-моделей РМЖ.

На первом этапе были получены 3D-модели, состоящие только из опухолевых (3De), только из стромальных (3Df) клеток и из совместно культивируемых опухолевых и стромальных клеток (3D-2). Далее к 3D и 3D-2 были добавлены PB-NK в соотношении 1:1. В качестве опухолевого компонента моделей использовали клетки линии MCF7, а в качестве стромального – опухолевые, опухоль-ассоциированные (ОАФ) и нормальные фибробласты. IL-15 или TGFβ добавляли одновременно с PB-NK.

Известно, что CD56^{bright} НК-клетки продуцируют провоспалительные цитокины, а CD56^{dim} – цитотоксическая субпопуляция.

Стимуляция IL-15 способствовала увеличению CD56⁺ клеток, а стимуляция TGFβ – снижению общего количества CD56⁺ клеток у всех экспериментальных моделей.

Стимуляция IL-15 значительно увеличивала количество CD56^{bright} PB-NK при их сокультивировании с 3Df из ОАФ. Добавление TGFβ способствовало увеличению количества CD56^{dim} PB-NK при их сокультивировании с 3Df из нормальных фибробластов и увеличению количества CD56^{bright} НК-клеток при сокультивировании с 3Df из ОАФ.

Использованные в работе PB-NK были описаны нами как CD56^{dim}, поэтому далее мы оценивали профиль рецепторов CD57, KIR и CD62L PB-NK-клеток в составе 3D-моделей. Анализ проводили, оценивая изменение величины относительной единицы флуоресценции (MFI). Способность CD56^{bright} НК-клеток реагировать на стимуляцию цитокинами коррелирует с экспрессией CD62L или CD57. А «киллерная» активность субпопуляций CD56^{dim} коррелирует с экспрессией собственных ингибирующих рецепторов, принадлежащих к семейству KIR.

Стимуляция как IL-15, так и TGFβ способствовала увеличению уровня MFI CD57 и CD62L PB-NK при их сокультивировании с 3Df из ОАФ, а с 3Df из опухолевых и нормальных фибробластов – способствовала снижению.

Уровень MFI KIR повышался при добавлении PB-NK ко всем экспериментальным моделям, что не зависело от типа дополнительной стимуляции.

Таким образом, показано, что стимуляция IL-15 или TGFβ приводит к изменению фенотипа НК-клеток и может способствовать повышению их цитотоксической активности.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122110700001-5.

The importance of studying and generating myeloid derived suppressor cells

Awad M.S.¹, Markov O.V.¹, Zenkova M.A.¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are a heterogeneous population of immune cells that play a crucial role in regulating immune responses. MDSCs are characterized by their immunosuppressive properties, which can be beneficial in certain contexts, such as preventing autoimmunity and promoting tolerance to transplants. However, MDSCs can also contribute to the progression of cancer and other diseases by suppressing anti-tumor immunity. In recent years, there has been growing interest in the therapeutic potential of MDSCs, particularly in the context of cancer immunotherapy.

MDSCs hold promise as a novel therapeutic approach for cancer and other diseases, but a deeper understanding of their biology and mechanisms of action is essential to harness their full potential. Unfortunately, to date there is no standardized method for generating MDSCs *ex vivo*, allowing to study their properties and develop mechanisms to modulate them, which makes the development of protocols for obtaining MDSC *ex vivo* a priority.

To generate MDSC from murine cells bone marrow precursors were used as a resource. The isolated cells were incubated 4-9 days with various combinations of cytokines and growth factors (GM-CSF, G-CSF, IL-6 and IL-4) and tumor condition medium.

To characterize the obtained cells phenotype of MDSC was determined by studying gene expression levels and flowcytometric analysis of extracellular as specific markers of MDSC (CD11b, MHCII, Ly6-C, ly6-G, CD11c, CD68, CD80, CD86 and F4/80). Also intracellular markers TGF- β , MMP-9 and IL-6 were analyzed. Gene expression profile of Immunosuppressive TGF- β 1, iNOS, PDL1, VEGF and MMP-9 genes were studied. Functional characterization of MDSC was determined by several techniques like: measuring the levels of immunosuppressive cytokines and growth factors and the concentration of reactive oxygen species released by the obtained MDSC, also the effect of MDSC on the proliferation of T-lymphocytes *ex vivo* was studied.

We have shown that for murine MDSC generation, incubation of bone marrow cells in the presence of 50 ng/ml IL-6, 10 ng/ml or 50 ng/ml GM-CSF and 30% conditioned tumor medium for 4 days allowed to obtain MDSC with the most optimal phenotype, immuno-inhibitory mRNA profile and immunosuppressive functional characteristics.

So this protocol for generating MDSC *ex vivo* represent first step in therapeutic potential for using MDSC in cancer and other diseases. However, a more comprehensive understanding of MDSCs biology and mechanisms of action is essential to develop effective strategies for manipulating their function. Future research should focus on identifying novel targets and developing rationally designed therapies that exploit the therapeutic potential of MDSCs.

This work was supported by RSF grant 19-74-30011.

Роль гидроксирования рибосомных белков в регуляции экспрессии генов

Золотёноква Е. А.¹, Гопаненко А. В.¹, Тупикин А. Е.¹, Кабилов М. Р.¹, Малыгин А. А.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Рибосомные белки uS12, uL2 и uL15 – белки рибосомы млекопитающих, подвергающиеся гидроксированию, которое осуществляется при помощи рибосомных оксигеназ. Эти белки располагаются в рибосоме вблизи декодирующего и пептидилтрансферазного центров. uS12 гидроксится по остатку пролина 62 (Pro62), uL2 гидроксится по 216 остатку гистидина (His216), а uL15 – по 39 остатку гистидина (His39). Остаток гистидина 39 (His39) рибосомного белка uL15 располагается вблизи ССА конца Е-сайт-связанной тРНК и примыкает к участку связывания циклогексимида – ингибитора трансляции.

Ранее было показано, что при внесении мутации His39Ala белок uL15, потерявший способность гидроксироваться, встраивается в рибосому, но при этом отсутствие гидроксирования приводит к снижению уровня полисом в клетках, продуцирующих такой белок [1].

Для дальнейшего исследования роли гидроксирования белка uL15 и его участия в регуляции экспрессии генов клетки НЕК293Т были трансфицированы плазмидными конструкциями, кодирующими 3xFLAG-меченую мутантную форму белка uL15 His39Ala, не способную гидроксироваться, или 3xFLAG-меченый белок дикого типа в качестве контроля. Как и в прошлом исследовании, наблюдалось статистически значимое снижение количества полисом в клетках с мутантным uL15. Затем при помощи RNA-seq анализа общеклеточной мРНК и мРНК, ассоциированной с полисомами, были выявлены гены, экспрессируемые дифференциально в зависимости от наличия мутации в белке (tDEGs и pDEGs соответственно). Всего было выявлено 229 активируемых и 89 подавляемых pDEGs и 133 активируемых и 122 подавляемых tDEGs [2].

Также были выявлены следующие особенности структуры мРНК дифференциально экспрессируемых генов: в клетках, продуцирующих мутантный uL15, был повышен уровень мРНК с короткой кодирующей последовательностью; уровень более распространенных мРНК также был повышен по сравнению с контролем. Кроме того, наблюдалось снижение уровня мРНК с длинной кодирующей последовательностью и более редких мРНК [2].

Полученные данные показывают важную роль гидроксирования остатка His39 белка uL15 как для правильного функционирования рибосом, так и для процессов трансляции в клетке.

1. Yanshina, D.D.; Gopanenko, A.V.; Karpova, G.G.; Malygin, A.A. Replacement of hydroxylated His39 in ribosomal protein uL15 with Ala or Thr impairs the translational activity of human ribosomes. // Mol. Biol. - 2020, - V. 54, - P. 449–457.

2. Zolotenkova E.A., Gopanenko A.V., Tupikin, A.E., Kabilov M.R., Malygin, A.A. Mutation at the site of hydroxylation in the ribosomal protein uL15 (RPL27a) causes specific changes in the repertoire of mRNAs translated in mammalian cells. // Int. J. Mol. Sci. - 2023, - V. 24. – P. 6173.

Исследование поддержано грантом РФФ № 22-14-00039.

Крабоподобные искусственные рибонуклеазы для разрушения миРНК в функционально значимых областях и подавления процессов канцерогенеза

Чиглинцева Д. А.¹, Патутина О. А.¹, Хейман Т.², Сенькова А. В.¹, Мирошниченко С. К.¹, Власов В. В.¹, Биченкова Е. В.², Зенкова М. А.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Университет Манчестера, Манчестер, Великобритания*

Известно, что развитие онкологических заболеваний ассоциировано со значительным увеличением уровня онкогенных миРНК. Внутриклеточные миРНК, в отличие от матричных РНК, характеризуются интенсивным биогенезом, высокими концентрациями и повышенной стабильностью. Эти качества еще более усиливаются при развитии патологических процессов. В связи с этим для разработки эффективной миРНК-направленной терапии требуются подходы, обеспечивающие быструю, необратимую и многооборотную инактивацию миРНК-мишеней. Перспективной стратегией для специфического ингибирования избыточного количества патогенных миРНК является применение миРНК-направленных сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз (миРНКаз).

В данном исследовании разработаны крабоподобные миРНКазы, состоящие из олигонуклеотида, комплементарного центральной области миРНК-мишени и двух каталитических пептидов, фланкирующих его по 5'- и 3'-концам. Отличительной особенностью разработанных соединений является их способность одновременно расщеплять как «seed» область миРНК, так и 3'-терминальный район. Было установлено, что наиболее эффективные структурные варианты крабоподобных миРНКаз (Crab-p-21 и Crab- α -17) обеспечивают каталитическое расщепление миРНК, способствуя полной деградации 2-кратного избытка миРНК-мишеней миРНК-21 или миРНК-17 уже через 24 ч. Кроме того, показано, что при совместном действии крабоподобных конъюгатов и РНКазы Н значительно усиливается индивидуальная каталитическая активность, как миРНКазы, так и фермента, приводя к синергическому расщеплению миРНК. Способность крабоподобных миРНКаз разрушать множественные копии миРНК обеспечивало высокую биологическую активность разработанных соединений в культурах опухолевых клеток и на ксенографтной модели аденокарциномы молочной железы, приводя к подавлению злокачественных свойств клеток и ингибированию роста опухоли.

Исследование поддержано грантом РФФ № 19-14-00250.

Липофильный пуриновый нуклеозид - ингибитор Tdp1 - эффективный сенсibilизатор топотекана *in vitro* и *in vivo*

Чернышова И. А.¹, Корниенко Т. Е.¹, Дырхеева Н. С.¹, Захаренко А. Л.¹, Дреничев М. С.², Лаврик О. И.¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда РАН, г. Москва, Россия

Противораковый препарат топотекан (Tpc) – ингибитор топоизомеразы 1 (Top1), способный стабилизировать ковалентные комплексы Top1-ДНК, возникающие в ходе каталитического цикла Top1. Под действием Tpc возникают одно- и двуцепочечные разрывы ДНК, что приводит к гибели опухолевых клеток. Тирозил-ДНК фосфодиэстераза 1 (Tdp1) гидролизует ковалентную связь Top1-ДНК, что приводит к снижению эффективности лечения Tpc. Использование нетоксичных ингибиторов Tdp1 в дополнение к Tpc является перспективной стратегией для повышения эффективности лечения этим препаратом.

В ходе работы была синтезирована серия липофильных производных нуклеозидов и проверена их способность ингибировать Tdp1. В ходе скрининга мы выявили ряд ингибиторов Tdp1 со значением IC₅₀ от 0,18 до 6 мкМ. С помощью МТТ теста на культуре клеток HeLa (рак шейки матки) было показано, что большинство исследуемых соединений не токсичны или умеренно токсичны в концентрации до 100 мкМ, а семь из них оказались эффективными сенсibilизаторами Tpc, то есть способны усиливать его действие *in vitro*. Согласно нашей гипотезе, применение комбинации Tpc и ингибиторов Tdp1 должно приводить к увеличению уровня повреждений ДНК. Методом Alkaline Comet assay мы оценили уровень повреждений ДНК клеток HeLa, обработанных только Tpc и его комбинацией с обнаруженными сенсibilизаторами. Уровень повреждений ДНК при использовании комбинации Tpc и трех ингибиторов Tdp1, отобранных как соединения-лидеры, увеличивался по сравнению с индивидуальным применением Tpc [1].

Далее мы протестировали эти соединения *in vivo* на модели лимфомы мышей RLS. Только для одного из соединений (577) наблюдали достоверное снижение массы опухоли при использовании его в комбинации с Tpc. В ходе исследования было показано, что соединение 577 приводит к нормализации кровотока, угнетенного действием опухоли, и к нормализации состояния печени. При однократном введении комбинации препаратов наблюдали снижение уровня метастазирования до единичных метастаз в печени у 30% животных; при двукратном метастазов обнаружено не было.

Таким образом нами было обнаружено нетоксичное соединение класса липофильных нуклеозидов, которое способно сенсibilизировать опухолевые клетки к действию топотекана как *in vitro*, так и *in vivo*, что делает его многообещающим кандидатом для проведения дальнейших исследований.

1. Chernyshova I. A. et al. The Lipophilic Purine Nucleoside—Tdp1 Inhibitor—Enhances DNA Damage Induced by Topotecan In Vitro and Potentiates the Antitumor Effect of Topotecan In Vivo //Molecules, 2022.

Исследование было поддержано грантом РФФ №23-74-01078.

Поиск маркеров множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток и разработка низкомолекулярных ингибиторов данного фенотипа.

Моралев А.Д.,^{1,2} Зенкова М.А.,¹ Марков А.В.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

В настоящее время одной из актуальных проблем в химиотерапии онкологических заболеваний является развитие множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) опухолевых клеток. Несмотря на обширные исследования механизмов формирования данного фенотипа, включающие гиперэкспрессию эффлюксных транспортеров (например, Р-гликопротеина (Р-гр)), к настоящему моменту недостаточно изучен регулом, контролирующей развитие МЛУ, а также отсутствуют одобренные для терапии селективные ингибиторы эффлюксных транспортеров. Целью данной работы стал поиск новых маркерных генов резистентности опухолевых клеток к доксорубину (Dox), и разработка селективных ингибиторов Р-гр на основе пентациклических тритерпеноидов, эффективно блокирующих МЛУ.

Путем ре-анализа кДНК микрочиповых данных (выявление связанных с резистентностью к Dox дифференциально экспресированных генов, их функциональная аннотация, построение и анализ генных сетей) был выявлен ряд потенциальных маркеров резистентности опухолевых клеток к Dox (известные: Р-гр, CCND1; новые: SEN1L, GJA1, TUBA4A, PLCB1, TCF3, ZYX, AVAT, EIF5, PGK1). Второй блок работ включал поиск низкомолекулярных ингибиторов Р-гр из библиотек полусинтетических тритерпеноидов, включающих оксадиазолы глицирретовой кислоты, амиды солосолона. Были идентифицированы амиды **sg-650** и **2g**, способные напрямую взаимодействовать с трансмембранным доменом Р-гр и эффективно блокировать его насосную функцию.

Ключевые слова: резистентность, Р-гликопротеин, тритерпеноиды

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-14-00374.

Получение и изучение активности эндолизина термофильного бактериофага AeriP46

Голосова Н.Н.^{1,2}, Морозова В.В.¹, Матвеев А.Л.¹, Козлова Ю.Н.¹, Хлусевич Я.А.^{1,2}, Тикунова Н.В.^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Эндолизины – фаговые белки, разрушающие связи в пептидогликане клеточной стенки бактерий, что приводит к нарушению осмотического давления и разрыву бактериальной клетки. Способность эндолизинов разрушать пептидогликан не только изнутри клетки, но и снаружи делает их перспективными антибактериальными агентами, актуальность разработки которых возросла с распространением множественной резистентности. Особый интерес вызывают пептидогликангидролазы термостабильных фагов в связи с тем, что они сохраняют свою активность при повышении температуры, это является важным технологическим преимуществом.

Эндолизин LysAP46 – это белок термофильного бактериофага AeriP46, инфицирующего *Aeribacillus pallidus*, с молекулярной массой около 32 кДа. Этот белок имеет структуру типичную для эндолизинов бактериофагов, инфицирующих грамположительные бактерии. LysAP46 содержит ферментативно-активный домен на N-конце и домен связывания клеточной стенки на C-конце.

В работе получен штамм *Escherichia coli* M15/pQE-70_LysAP46 – продуцент рекомбинантного термостабильного эндолизина LysAP46. Эндолизин наработан и очищен с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе.

Наличие активности у рекомбинантного эндолизина LysAP46 оценивали с помощью метода зимографии. Результаты зимографии подтвердили, что эндолизин LysAP46 проявляет гидролитическую активность в отношении клеточных стенок *A. pallidus* КЭМТК 656, *S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. haemolyticus*, в том числе и относительно клеточных стенок штаммов, обладающих устойчивостью к двум и более антибиотикам из разных классов. Термостабильность эндолизина LysAP46 проверили также методом зимографии после инкубации при 60°C, 70°C и 80°C в течение 30 минут. Результаты эксперимента показали, что эндолизин LysAP46 сохраняет гидролитическую активность в отношении клеточной стенки *S. aureus* КЭМТК 1685 даже после его инкубации при 80°C.

Показана способность LysAP46 разрушать биопленки, сформированные разными представителями рода *Staphylococcus*, уже через 3 часа после нанесения.

В данной работе был получен штамм-продуцент рекомбинантного термостабильного эндолизина LysAP46, продемонстрирована способность этого белка разрушать клеточные стенки различных представителей порядка *Bacillales* и сохранять свою гидролитическую активность относительно клеточных стенок после нагревания, а также его гидролитическую активность относительно биопленок, сформированных представителями рода *Staphylococcus*.

Исследование выполнено при поддержке ФНТП 2021-1930-ФП5-8365-8981 (Соглашение 075-15-2021-1085).

Новые производные изоалантолактона как противоопухолевые кандидаты: акцент на рак молочной железы и мультиформную глиобластому

Кичкина Д. О.^{1,2}, Патрушев С. С.^{1,2,3}, Шульц Э. Э.³, Зенкова М. А.¹, Марков А. В.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск

³ Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск

Природные метаболиты являются ценным источником для разработки фармацевтических препаратов. Одним из примеров низкомолекулярных природных соединений, перспективных для создания лекарственных кандидатов, является изоалантолактон (ИАЛ). Данное соединение проявляет широкий спектр биологических активностей, в том числе противоопухолевую. С целью усиления фармакологического потенциала ИАЛ, был синтезирован ряд новых азотсодержащих производных данного соединения, несущих различные заместители в положении С-13.

В данной работе был проведен скрининг цитотоксичности новых производных изоалантолактона в отношении опухолевых клеток различного происхождения и нетрансформированных фибробластов человека. В результате анализа было показано, что исследуемые производные вызывают гибель опухолевых клеток в микромолярных концентрациях и идентифицировано соединение **8c**, обладающее наибольшим уровнем цитотоксичности и селективности ($IC_{50}^{(MCF-7)} = 8 \pm 0,1$ мкМ, индекс селективности = 12,5). Исследование его механизма действия на модели клеток MCF-7 показало, что **8c** вызывает гибель этих клеток путем запуска окислительного стресса и митохондриального пути апоптоза.

В ходе исследований анти-глиобластомного потенциала с использованием *in silico* подхода выявлено восемь производных ИАЛ, потенциально способных проникать сквозь гемато-энцефалический барьер. Для этих соединений была проанализирована способность подавлять агрессивные свойства клеток глиобластомы *in vitro* и выявлено соединение **9**, эффективно снижающее в нетоксичных концентрациях подвижность, клоногенные и адгезивные свойства клеток глиобластомы человека U118. Данные свойства соединения **9** были далее верифицированы *in vitro* на клеточных линиях глиобластомы человека U87 и глиомы мыши EPNT5.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-14-00374.

Биопленки бактерий: визуализация, строение, эффект антибактериальных препаратов

Рябова Е. С.¹, Задворных Д. А.¹, Бардашева А. В.¹, Григорьева А. Е.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Биопленки, состоящие из бактерий и продуцируемого ими матрикса, являются распространённой формой существования бактерий. Матрикс обеспечивает высокую устойчивость бактерий к внешним факторам среды, включая антибактериальные препараты. Биопленки осложняют течение многих заболеваний; часто формируются на протезах и имплантатах. Предотвращение образования и уничтожение биопленок являются актуальной задачей биомедицины.

Известные стратегии борьбы с патогенными бактериями не всегда эффективны против биопленок, что определяет необходимость создания новых противомикробных средств, в частности, препаратов сочетанного действия. Гибридное соединение (А-730), на основе поликатионного амфифила DL412 и ципрофлоксацина, получено в лаборатории органического синтеза ИХБФМ СО РАН. Показана эффективность препаратов А-730 и DL412 против планктонной формы бактерий.

В данной работе изучали воздействие препаратов А-730, DL412 и ципрофлоксацина на биопленки *Salmonella enterica* ATCC 14028 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. В лабораторных условиях биопленки *S. aureus* представлены тонкой пленкой, прикреплённой к твердому субстрату (агаровой подложке), тогда как биопленки *S. enterica* имеют вид бесформенных скоплений в толще жидкой питательной среды.

Микроскопические методы исследования являются необходимым инструментом изучения особенностей строения биопленок и их реакции на антибактериальные препараты. Методы визуализации и фиксации биопленок разработаны недостаточно, опубликованы единичные работы, не позволяющие воспроизвести методики на разных видах бактерий и биопленок. Мы проверили разные варианты фиксации биопленок. Фиксация параформальдегидом не обеспечивает сохранность биопленок.

Фиксация по Люфту, с использованием рутениевого красного, обеспечивает сохранность структуры биопленок и матрикса, но плохо сохраняет ультраструктуру бактерий. Фиксация по Ито-Карновски, с использованием пикриновой кислоты, сохраняет структуру биопленки и ультраструктуру бактерий, но не сохраняет матрикс.

Метод парафиновых срезов позволяет изучать участки биопленки большой площади. Биопленки *S. aureus* выглядят как слой клеток с волнистым верхним краем, на котором локализован матрикс; нижний край ровный. Биопленки *S. enterica* на срезах имеют вид «островов» матрикса, в который погружены клетки.

Препараты А-730, DL412 и ципрофлоксацин в дозах, эффективных против планктонной культуры, не влияют на структуру биопленок *S. enterica*. В биопленках *S. aureus* выявлены деструктивные изменения клеточного слоя и матрикса. Нами впервые визуализирован матрикс биопленки *S. aureus*, и описана его ультраструктура. Полученные данные позволили определить комплекс методов, обеспечивающий полный анализ структуры биопленок на световом и ультраструктурном уровнях.

Эпителиально-мезенхимальный переход как связующее звено между воспалением и прогрессией рака легкого

Одаренко К.В.¹, Зенкова М.А.¹, Марков А.В.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Рак легкого (РЛ) занимает первое место по смертности среди онкологических заболеваний в Российской Федерации. Лечение РЛ затрудняют метастазирование и развитие лекарственной устойчивости. В настоящей работе мы показали, что данные процессы поддерживаются воспалительным микроокружением опухоли путем запуска эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Перспектива ЭМП как терапевтической мишени была продемонстрирована на примере разработки лекарственных агентов на основе пентациклических тритерпеноидов.

ЭМП включает усиление подвижности и инвазивности опухолевыми клетками, в результате чего они проникают в кровеносные сосуды, запуская метастазирование. Кроме того, индукция ЭМП обогащает популяцию раковых стволовых клеток (РСК), обладающих устойчивостью к радио- и химиотерапии. Установлено, что фибробласты, макрофаги, гранулоциты и лимфоциты из воспалительного микроокружения индуцируют ЭМП клеток РЛ через сигнальные пути медиаторов воспаления, включая цитокины (IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , TGF- β , IL-4 и IL-10), хемокины (CCL2, CXCL12 и IL-8) и простагландины (PGD2, PGE2).

Показано, что пентациклические тритерпеноиды снижают метастазирование и стволовые свойства клеток РЛ через ингибирование сигнальных путей воспалительного ЭМП: TGF- β , TNF- α , integrin α V β 5, EGFR, ALDH1A1 и Skp2.

Ключевые слова: воспаление, рак легкого, эпителиально-мезенхимальный переход, тритерпеноиды.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-74-30011.

От молекулярной биологии к фундаментальной медицине

Опухоль-индуцированная иммуносупрессия — механизмы и методы коррекции

Марков О.В., Авад М., Зенкова М.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

В современном мире смертность от опухолевых заболеваний занимает одно из первых мест в мире. В настоящий момент основными терапевтическими подходами для лечения опухолевых заболеваний являются методы хирургической резекции, а также химио- и радиотерапии, не обладающие или обладающие слабым таргетным действием. Несомненно, современная наука предоставляет новые высокоэффективные инструменты для более направленного лечения опухолей и метастазирования, одобренные регулируемыми органами для применения в клинической практике, в том числе дендритно-клеточные вакцины, CAR T-лимфоциты, блокировка иммунологических чек-пойнтов и т.д. Тем не менее, эффективность современных терапевтических подходов значительно снижается за счет иммуносупрессии, сопровождающей практически любой опухолевой процесс. Своевременная коррекция опухоль-индуцированной иммуносупрессии может позволить значительно увеличить эффективность как новых высокотаргетных, так и конвенциональных стратегий лечения онкологических заболеваний.

В докладе будут рассмотрены основные молекулярные и клеточные механизмы опухоль-индуцированной иммуносупрессии, а также рассмотрены современные молекулярно-биологические и иммунологические инструменты ее коррекции, исследованные как на опухолевых моделях *in vivo*, так и уже одобренные для применения в клинической практике.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-74-30011.

Онколитический вирус VV-GMCSF-Lact в комбинированной химиотерапии глиом

Агеенко А. Б.¹, Васильева Н. С.^{1,3}, Бывакина А. А.¹, Кочнева Г. В.²,
Рихтер В. А.¹, Кулигина Е. В.^{1,3}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

²ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск, Россия

³ООО «Онкостар», Новосибирск, Россия

Онколитическая виротерапия является одним из перспективных направлений в лечении злокачественных новообразований различного гистогенеза, в том числе глиобластом. Несмотря на многочисленные преимущества данного подхода, монотерапия вирусными препаратами не всегда эффективна из-за природы самих вирусов и высокой гетерогенности глиом. На сегодняшний день использование схем комбинированной терапии, в том числе совместно с темозоломидом (ТМЗ), который является основным химиотерапевтическим препаратом в лечении глиобластом, является многообещающим направлением биомедицинских исследований.

Данная работа направлена на изучение онкотоксической активности *in vitro* и противоопухолевой эффективности *in vivo* комбинации рекомбинантного онколитического вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact и темозоломида в отношении глиобластомы человека.

В экспериментах *in vitro* показано, что наибольшим цитотоксическим эффектом в отношении клеток глиобластомы U87MG обладает комбинация препаратов ТМЗ+VV-GMCSF-Lact, когда клетки сначала обрабатывают ТМЗ, а затем вирусом. При терапии опухолей U87MG, полученных при трансплантации клеток глиобластомы иммунодефицитным мышам линии SCID, показано, что VV-GMCSF-Lact в режиме монотерапии является более эффективным препаратом по сравнению с ТМЗ. При использовании комбинации VV-GMCSF-Lact с ТМЗ продемонстрировано, что введение ТМЗ в схему терапии значительно не влияет на эффективность лечения. Индексы торможения роста опухоли (ТРО) составили 90% для схемы ТМЗ+VV-GMCSF-Lact, 86% – VV-GMCSF-Lact+ТМЗ, 83% – VV-GMCSF-Lact, 53% – ТМЗ.

Таким образом, показано, что при терапии глиобластомы человека онколитическим вирусом VV-GMCSF-Lact введение темозоломида в терапевтическую схему нецелесообразно. Тем не менее, комбинированная терапия онколитическими вирусами с иммунотерапевтическими подходами в отношении глиом является перспективным направлением для дальнейших биомедицинских исследований.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-14-00195, <https://rscf.ru/project/21-14-00195/>.

Функциональный анализ малых ядрышковых РНК в клетках аденокарциномы легких человека A549 в условиях заражения вирусом гриппа А

Журавлев Е. С.¹, Сергеева М. В.², Матвеева А. М.¹, Комиссаров А. Б.², Степанов Г. А.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *НИИ гриппа им. А. А. Смородиной, Санкт-Петербург, Россия*

Данная работа направлена на изучение функций коротких регуляторных РНК, а именно класса малых ядрышковых РНК (мяоРНК), в клетках человека в условиях заражения вирусом гриппа А. На первом этапе, в качестве модельной системы были подготовлены препараты клеток линии аденокарциномы легких человека A549, зараженных вирусом гриппа А/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). Было проведено транскриптомное исследование изменений в уровне представленности мРНК и нкРНК, а также коротких РНК (<200 н.) в клетках человека в условиях вирусной инфекции. Биоинформатический анализ результатов секвенирования poly-A-фракции подтвердил активацию основных функциональных кластеров, характерных для инфекции клеток вирусом гриппа. Анализ фракции коротких РНК позволил выявить отдельные малые ядрышковые РНК, а также укороченные формы мяоРНК, представляющие собой 5'- и 3'-фрагменты зрелых мяоРНК, со значительно повышенным (SNORD93, SNORD11, SNORD1B, SNORD8) и пониженным (SNORD58A, SNORD42A, SNORD79) содержанием в клетках в условиях вирусной инфекции. Обнаруженные изменения в уровне экспрессии ряда малых ядрышковых РНК были верифицированы методом ОТ-ПЦР, в том числе с использованием stem-loop-обратных праймеров для селективной детекции 5'- и 3'- укороченных форм процессинга мяоРНК. Выявленные изменения в профиле экспрессии малых ядрышковых РНК позволяют предположить наличие неканонических функций этих РНК в регуляции инфекции клеток человека вирусом гриппа.

На втором этапе, для расширения представлений об участии малых ядрышковых РНК в регуляции инфекции клеток человека вирусом гриппа А, с помощью технологии CRISPR/Cas9 были получены клеточные линии на основе клеток человека A549 с подавлением уровня зрелой мяоРНК SNORD93 и уровня 5'- и 3'-форм её процессинга (уровень 5'- и 3'-форм процессинга мяоРНК SNORD93 достоверно повышался в исходных клетках A549 в условиях инфекции вирусом гриппа А). Модифицированные клеточные линии были использованы для изучения чувствительности к заражению вирусом гриппа. В частности, было показано снижение уровня вирусной РНК в клеточных линиях с подавлением SNORD93 относительно исходной клеточной линии через 24 и 48 часов после заражения вирусом гриппа А. Полученный результат указывает на важную роль мяоРНК SNORD93, а также форм её процессинга в развитии инфекции вирусом гриппа А в клетках аденокарциномы легких человека A549.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122022100238-7 (получение модифицированных клеточных линий) и гранта РФФИ № 23-25-00450 (ОТ-ПЦР анализ).

Isolation and functional analysis of murine splenic neutrophils

Sounbuli Kh.^{1,2}, Alekseeva L.A.¹, Markov O.V.¹ and Mironova N.L.¹

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*

²*Faculty of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

Neutrophils are the main player in innate immunity. They perform their antimicrobial activity through three mechanisms: phagocytosis, degranulation, and production of neutrophil extracellular traps (NETs). NETs are webs of neutrophil genomic material decorated with active enzymes of neutrophil granules. These webs could trap and kill the pathogens. Splenic neutrophils, which mainly originate from clearance to the spleen, are of great interest because they reflect the actual status of neutrophils in different disease settings. For example, during tumor development, they could represent tumor-associated neutrophils. However, there is not much information about the isolation and functional effectiveness of splenic neutrophils. Here we compare four protocols for mouse splenic neutrophil isolation, based on Ficoll gradient centrifugation and immunomagnetic selection, compared with bone marrow derived neutrophils. Isolated neutrophil functionality was confirmed on the basis of NET formation in response to different activators and the neutrophil oxidative burst test.

C57Bl/6 male mice aged 3-4 months were euthanized by cervical dislocation. The spleen and bone marrow were harvested, followed by the preparation of cell suspensions. Neutrophil isolation was performed using Ficoll density gradient protocols (Ficoll 1.077/1.119 g/ml or Ficoll 1.083/1.090/1.110 g/ml density gradient) or using immunomagnetic negative selection (EasySep™ Mouse Neutrophil Enrichment Kit) or positive selection where cell suspensions were stained with rat anti-mouse Ly6G and then incubated with magnetic beads bound with sheep anti-rat IgG (Dynabeads™). Labeled cells were separated by magnetic field. Isolated neutrophils were tested for NETosis and neutrophil oxidative burst.

Ficoll protocols and immunomagnetic negative selection led to low purity populations (5-40%). Positive selection was suitable for splenic neutrophil isolation and resulted in high purity (> 95%) and viability (>90%). The isolated cells showed some features of spontaneous activation; however, they formed NETs in response to chemical agents (PMA, A23187) and in less effectiveness to physiological activators (LPS). Neutrophil oxidative burst analysis showed higher ROS levels in A23187-treated neutrophils than in controls.

In conclusion, splenic neutrophils could be isolated using immunomagnetic of positive selection with preserved functionality.

The work was supported by RSF grant № 22-14-00289.

Получение и характеристика радиорезистентных вариантов клеток линии HeLa

Тальшев В. А.¹, Логашенко Е. Б.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Рак шейки матки является 4ым по частоте и по смертности среди всех видов рака у женщин во всём мире. Лучевая терапия считается эффективным методом лечения больных РШМ и применяется в большинстве случаев в качестве самостоятельного метода лечения опухоли данного типа. Основным фактором, приводящим к неудачам лучевой терапии и плохому прогнозу у пациентов с опухолями, является радиорезистентность. Однако механизмы, ответственные за развитие радиорезистентности опухолевых клеток при раке шейки матки, в значительной степени не выявлены. Для изучения этих механизмов в первую очередь необходимы клеточные модели.

В данной работе методом многократного дробного облучения были получены радиорезистентные варианты клеточной линии аденокарциномы шейки матки HeLa. Были получены варианты с суммарной дозой 20, 40 и 60 Гр. Оценивали уровень чувствительности к радиации в полученных радиорезистентных вариантах по сравнению с нативной клеточной линией. Выявлено дозозависимое снижение радиационной чувствительности клеток с ростом накопленной суммарной дозы облучения.

Исследование было поддержано грантом РФФ №19-74-30011

Изменение профиля экспрессии нормальных и трансформированных клеток в ответ на присутствие внеклеточной ДНК

Филатова А. А.^{1,2}, Алексеева Л. А.¹, Миронова Н. Л.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Предполагается, что опухолеассоциированные вДНК могут опосредовать изменения фенотипа нормальных клеток и способствовать формированию микроокружения опухоли. Однако вопрос о способности вДНК усиливать инвазивный потенциал опухолевых клеток все еще остается дискуссионным.

На модели меланомы мыши В16 исследовали способность вДНК из сыворотки крови мышей с меланомой (В16_s-вДНК) влиять на параметры опухолевого роста и изменение в опухолевых клетках представленности и экспрессии онкогенов, мобильных генетических элементов (МГЭ) и ДНКаз. Исследование представленности фрагментов в пуле В16_s-вДНК с помощью qPCR показало, что В16_s-вДНК обогащена фрагментами онкогенов *Myc*, *Ras* и *B1_mus2*. Инкубация клеток В16 в присутствии В16_s-вДНК (1000 нг/млн. кл.) в течение 24 ч приводила к увеличению представленности фрагментов *Myc*, *Ras* и *B1_mus2*. ВДНК из сыворотки крови здоровых мышей (h-вДНК) вызывала увеличение представленности только фрагментов *B1_mus2*, не оказывая влияния на онкогены. Ни h-вДНК, ни В16_s-вДНК не вызывали в клетках В16 изменения представленности ретротранспозона *L1td1*. Таким образом, полученные результаты указывают на существование механизмов проникновения вДНК в клетки меланомы В16.

Несмотря на то, что представленность фрагментов *Myc* и *Ras* увеличилась в составе ДНК, повышения экспрессии среди онкогенов в присутствии В16_s-вДНК не было обнаружено. Напротив, в ответ на h-вДНК произошло повышение экспрессии *Ras* и *Fos*. Похожая тенденция наблюдалась в случае *L1td1*, повышенная экспрессия которого наблюдалась в присутствии обоих типов вДНК — h-вДНК опосредовала более высокие уровни экспрессии ретротранспозона по сравнению с В16_s-вДНК. В качестве естественного ответа на присутствие экзогенной вДНК увеличивалась экспрессия мРНК, кодирующих некоторые ДНКазы. Оказалось, что h-вДНК повышает экспрессию мРНК, кодирующей внутриклеточную секреторную ДНКазу *Dnase1L3* и митохондриальную ДНКазу *EndoG*. В присутствии В16_s-вДНК наблюдалось увеличение экспрессии только *Dnase1L3*. В то же время вДНК обоих типов привела к достоверному снижению уровня экспрессии ингибитора ДНКазы *Dffb* — *Dffa*.

В16_s-вДНК при воздействии на клетки В16 вызывает увеличение экспрессии ДНКаз, как естественный ответ клетки на присутствие избыточных ДНК; увеличение экспрессии онкогенов, являющихся триггерами большого числа сигнальных каскадов от блокировки апоптоза до усиления пролиферации опухолевых клеток.

Filatova A. A. et al. The Effect of Cell-Free DNA from Blood Serum of Mice with Metastatic Melanoma on Enhancement of Oncogenic Properties of Melanoma Cells //Biochemistry (Moscow). – 2023. – Т. 88. – №. 7. – С. 995-1007.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 22-14-00289

Трансплантация кишечной микробиоты при лечении пациентов с язвенным колитом: изменения микробиома и клинические результаты

Федорец В. А.¹, Тикунов А. Ю.¹, Шрайнер Е. В.¹, Морозов В. В.¹,
Тикунова Н. В.¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Язвенный колит (ЯК) – это хроническое аутоиммунное воспаление слизистой оболочки дистальных отделов кишечника с неустановленной этиологией и предположительно многофакторным патогенезом. Была показана роль кишечной микробиоты в патогенезе заболевания, в связи с чем возможным способом лечения является трансплантация кишечной микробиоты от здоровых доноров, или фекоотрансплантация (ФТ).

В ходе работы был проведен сравнительный анализ кишечного микробиома пациентов с ЯК до и после ФТ, а также оценены клинические результаты лечения. Для этого были созданы 58 библиотек ампликонов переменных участков (V3-V4) гена 16S рРНК (по 20 библиотек для пациентов до и после лечения, 18 библиотек для здоровых добровольцев). Полученные библиотеки секвенировали на платформе Illumina MiSeq. Результаты анализировали с использованием пакета программного обеспечения QIIME 2. Долговременные клинические результаты были оценены с помощью опроса пациентов о их состоянии после процедуры.

Биоразнообразие микробиоты пациентов с ЯК до лечения в нашем исследовании оказалось в среднем достоверно ниже, чем у здоровых людей. Статистический сравнительный анализ разнообразия между выборками здоровых добровольцев и пациентов с ЯК до лечения показал достоверное снижение у пациентов долей типов Desulfobacterota и Synergistota, представители которых являются составляющей нормальной кишечной микробиоты, а также повышение доли некоторых потенциально патогенных протеобактерий (роды *Sphingomonas*, *Vibrio* и *Halomonas*).

В образцах от пациентов после ФТ было выявлено достоверное повышение среднего биоразнообразия по сравнению с образцами, полученными до ФТ (p -value $\leq 0,05$), а также снижение доли некоторых потенциально патогенных бактерий. Однако у 5 пациентов было обнаружено значительное повышение доли рода *Fusobacterium* (тип Fusobacteriota) одновременно со снижением биоразнообразия, что может говорить о инвазивности этих бактерий.

Клиническая ремиссия была достигнута у 19 (95%) пациентов на 8-й неделе после лечения. Побочные эффекты возникли у пяти пациентов в первые дни после процедуры, однако только у одного из них не возникло в дальнейшем клинического ответа на лечение. У 38% опрошенных пациентов ремиссия сохранялась на протяжении года, у 31% – более двух лет.

Таким образом, эффективность ФТ для лечения ЯК была подтверждена; однако продолжительность ремиссии существенно варьировала, что может быть следствием особенностей исходной микробиоты пациентов. Анализ микробиома пациента перед проведением ФТ и целенаправленный выбор доноров может повысить эффективность лечения.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 21-14-00360.

Молекулярно-генетические аспекты варикозной болезни нижних конечностей

Короленя В. А.^{1,2}, Сметанина М. А.^{1,2}, Филипенко М. Л.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Варикозное расширение вен – это многофакторное патологическое состояние, связанное с повреждением венозной стенки и клапанов и сопровождаемое застоем крови. Его наиболее частой формой является варикозная болезнь нижних конечностей (ВБНК), которая широко распространена в развитых странах (около 30% среди взрослого населения). Отсутствие лечения может приводить к серьезным проблемам со здоровьем и даже к смерти, поэтому информирование и разработка терапевтических подходов является актуальной задачей здравоохранения.

Причинами манифестации ВБНК могут служить наследственные факторы (известно 12 надежных однонуклеотидных полиморфизмов, которые объясняют 13% наследственности ВБНК), антропометрические характеристики и образ жизни [1]. Важное значение в изучении молекулярного патогенеза ВБНК имеет выявление дифференциальной экспрессии генов. Нами была показана дифференциальная экспрессия генов, связанных с регуляцией внеклеточного матрикса, цитоскелета, нервной регуляцией, метаболизмом и воспалением [2,3]. Также были получены данные о метилировании локусов, ассоциированных с генами, которые могут быть причинными в развитии ВБНК [3,4]. Выявлено снижение целостности и количества митохондриальной ДНК в варикозно трансформированных венах [5].

Полученные данные вносят вклад в изучение патогенеза ВБНК и приближают исследователей к разработке профилактических мер и подходов персонализированной медицины.

1. Сметанина М.А. и др. Генетические основы хронических заболеваний вен нижних конечностей: обзор современных представлений. *Флебология*. 2016;10(4):199- 213, doi:10.17116/flebo2016104199-213
2. Короленя В.А. и др. Экспрессия генов *ACTA1*, *PLXNA4* и *SEMA3A* в группах пациентов с варикозной болезнью нижних конечностей с разной протяженностью патологического рефлюкса в большой подкожной вене. *Флебология*. 2022;16(4):270-278, doi:10.17116/flebo202216041270
3. Smetanina, Mariya A et al. “DNA methylation and gene expression profiling reveal *MFAP5* as a regulatory driver of extracellular matrix remodeling in varicose vein disease.” *Epigenomics* vol. 10,8 (2018): 1103-1119. doi:10.2217/epi-2018-0001
4. Smetanina, Mariya A et al. “Epigenome-Wide Changes in the Cell Layers of the Vein Wall When Exposing the Venous Endothelium to Oscillatory Shear Stress.” *Epigenomes* vol. 7,1 8. 20 Mar. 2023, doi:10.3390/epigenomes7010008
5. Smetanina, Mariya A et al. “Quantitative and structural characteristics of mitochondrial DNA in varicose veins.” *Vascular pharmacology* vol. 145 (2022): 107021. doi:10.1016/j.vph.2022.107021

Исследование было поддержано проектом ПФНИ РФ (2021-2030) 0245-2021-0006 «Фундаментальные основы здоровьесбережения»

Диагностика заболеваний на молекулярном уровне

Диагностика мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* и дефицита гомологичной рекомбинации (HRD) для назначения ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP)

Кечин А.А.¹, Михеева Р.Е.¹, Корюков М.А.¹, Боярских У.А.¹, Тархов А.В.², Филипенко М.Л.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия

² Городская клиническая больница №1, г. Новосибирск, Россия

Внедрение в клиническую практику ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) значительно повысило эффективность терапии рака яичников. Данные препараты обладают меньшей токсичностью и вызывают гибель опухолевых клеток, имеющих нарушения в системе репарации двуцепочечных разрывов с помощью гомологичной рекомбинации (HRD). Поэтому необходимым этапом применения такой терапии является диагностика таких нарушений. Первоначально выявление HRD проводилось только по наличию патогенных вариантов в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Такие варианты могли быть представлены как точечными мутациями, так и протяженными делециями и дупликациями целых экзонов, а в некоторых случаях – и всего гена. Однако число генов, белковые продукты которых участвуют в репарации двуцепочечных разрывов значительно больше, и были разработаны несколько тестов, позволяющие обнаруживать HRD по определенным паттернам накапливаемых в опухоли крупных перестроек. Одним из таких подходов является исследование около 50 тысяч SNP по всему геному, по которым оценивается суммарный показатель HRD. Такой подход упрощает выявление HRD, однако также является сложным и дорогим по исполнению.

Начиная с 2015 года, нами были разработаны подходы по выявлению как точечных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, так и вариаций числа копий (CNV) целых экзонов; были определены частоты встречаемости герминальных вариантов среди более 1300 пациентов по всей России. В настоящий момент нами проводится поиск повторяющихся крупных геномных перестроек, по которым было бы возможно идентифицировать HRD в образцах опухоли. Для этого три образца высокомолекулярной ДНК (два – из свежемороженой опухолевой ткани с мутацией в гене *BRCA1* и один – из лейкоцитов крови) были секвенированы на платформе Oxford Nanopore. Для выявления крупных геномных перестроек был разработан собственный алгоритм. Для двух образцов ДНК из опухолевой ткани, несущих герминальную мутацию в гене *BRCA1*, было предсказано на порядок больше tandemных дупликаций в расчете на 1 тысячу прочитанных нуклеотидов, чем для образца ДНК из лейкоцитов крови. Точные границы данного типа перестроек и их последовательности будут использованы для поиска перестроек, повторяющихся в накопленной выборке образцов ДНК из опухолевой ткани рака яичников с мутацией в гене *BRCA1*.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-74-01138 «Новые алгоритмы выявления крупных геномных перестроек для диагностики дефицита гомологичной рекомбинации».

Повышенный уровень циркулирующей внеклеточной ДНК как маркёр суицидальных попыток в анамнезе пациентов с шизофренией

Меламуд М. М.¹, Ермаков Е. А.¹, Брит П. И.¹, Журавлёв Е. С.¹, Балахонова Е. А.¹, Степанов Г. А.¹, Камаева Д. А.², Иванова С. А.², Невинский Г. А.¹, Бунева В. Н.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия*

Внеклеточная ДНК (вкДНК) — это фрагменты нуклеиновых кислот, высвобождающиеся из клеток при их разрушении. ВкДНК выполняет функцию алармина, сигнализируя иммунным клеткам о разрушении клетки. Повышенный уровень циркулирующей вкДНК — неспецифический маркёр многих воспалительных заболеваний. Однако, иногда в кровотоке происходит чрезмерное накопление вкДНК, что может привести к формированию стерильного очага воспаления. В последнее время появляется всё больше подтверждений того, что увеличение концентрации циркулирующей вкДНК характерно не только для конвенциональных воспалительных заболеваний. Так, описывается повышение уровня циркулирующей вкДНК для многих психических заболеваний: депрессивное расстройство, биполярное расстройство, шизофрения. Также известны данные о том, что вкДНК повышена в кровотоке людей, совершавших попытки самоубийства. Однако, в этих исследованиях описываются люди с попытками самоубийства без учета определенной патологии. Актуальность этого исследования заключается в том, что впервые проанализирована концентрация циркулирующей вкДНК у пациентов с шизофренией с попытками суицида в анамнезе и без них, а также у здоровых доноров.

В исследовании использовалась плазма крови 58 пациентов (общая группа) с шизофренией (31 человек с попытками суицида в анамнезе и 27 без таковых), а также 85 здоровых доноров. Все группы были сопоставимы по половозрастному составу. Концентрацию общей вкДНК определяли флуориметрическим методом на флуориметре Qubit 4 (ThermoFisher Scientific, Германия). Концентрация ядерной и митохондриальной вкДНК определялась методом цифровой ПЦР на приборе QIAcuity One с использованием реагентов (Qiagen, Германия).

Уровень общей и ядерной циркулирующей вкДНК достоверно выше в общей группе пациентов с шизофренией, чем у здоровых доноров. Концентрация общей и ядерной циркулирующей вкДНК в подгруппе пациентов с попытками суицида в анамнезе достоверно выше, чем у пациентов с шизофренией без попыток суицида в анамнезе и здоровых доноров. Концентрация циркулирующей митохондриальной вкДНК статистически не различалась во всех трёх группах пациентов с шизофренией (общая, с попытками суицида в анамнезе, без попыток суицида в анамнезе). ROC-анализ показал, что вкДНК может являться перспективным маркёром для ретроспективного выявления попыток суицида у пациентов с шизофренией. Чувствительность и специфичность составили 70% и 71% соответственно.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 21-75-00102.

Определение уровня опухоли-ассоциированных miR-24 и miR-101 в составе экзосом плазмы крови и асцитической жидкости у больных с раком яичников

Джугашвили Е. И.^{1,2}, Тамкович С. Н.^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Актуальность. Рак яичников (РЯ) занимает 9 место в структуре онкологических заболеваний среди женщин. Заболеваемость РЯ в России достигает 10,17 на 100 тыс. населения. Причиной высокой смертности от данного новообразования является позднее выявление заболевания. Для увеличения качества и продолжительности жизни пациентов, на основе «жидкостной биопсии», в том числе с использованием экзосом, ведутся попытки уточнения молекулярного портрета опухоли.

Цель исследования. Оценить относительный уровень опухоли-ассоциированных микроРНК в экзосомах из плазмы крови и асцитической жидкости больных с РЯ для поиска перспективных экзосомальных маркеров «жидкостной биопсии».

Материалы и методы. Для сравнения диагностической значимости экзосомы из плазмы крови здоровых женщин (ЗЖ, n = 39) и из плазмы и асцитической жидкости первичных больных с диссеминированным РЯ ШВ-ШС стадии (n = 20) были выделены методом ультрафильтрации с последующим ультрацентрифугированием. Природу полученных везикул подтверждали трансмиссионной электронной микроскопией и проточной цитофлуориметрией с использованием антител против CD9, CD24, CD63 и CD81. РНК-мишени в составе экзосом были выбраны с помощью баз данных DIANA и STRING. Уровень экзосомальных микроРНК оценивали после выделения РНК и проведения ОТ-ПЦР в режиме «реального времени». Полученные данные нормировали на исходный объем биологических жидкостей и на уровень miR-16.

Результаты и их обсуждение. С помощью биоинформатического анализа установлена взаимосвязь между 8 генами, регулируемые микроРНК miR-101 и -24-3p, и все эти гены меняют экспрессию при РЯ, что косвенно указывает на участие miR-101 и -24-3p в канцерогенезе и диссеминации РЯ. Выявлено статистически значимое изменение уровней miR-24 и miR-101 в составе экзосом плазмы при РЯ по сравнению с нормой, а также достоверная корреляция уровней опухоли-ассоциированных miR-24 и miR-101 в плазме крови и асцитической жидкости больных РЯ ($R=0,800$, $p<0,001$ и $R=0,998$, $p<0,001$ соответственно). Не выявлено корреляции между уровнями miR-24 и miR-101 в экзосомах плазмы и в экзосомах асцитической жидкости с возрастом, семейным анамнезом, объемом асцитической жидкости у пациентов с РЯ и индексом перитонеального карциноматоза, однако уровень miR-101 в экзосомах асцитической жидкости коррелировал со стадией FIGO ($p = 0,03$).

Выводы. Полученные результаты подтверждают перспективность miR-24 и miR-101 в качестве диагностических маркеров для «жидкостной биопсии» и предикторов агрессивного течения РЯ.

Внеклеточные микроРНК мочи как маркеры кастрационной резистентности при раке предстательной железы

Сайткулова М. М.^{1,2}, Брызгунова О. Е.^{1,3}, Мурина Е. А.¹, Остальцев И. А.³, Пак С. В.³,
Лактионов П. П.^{1,3}, Коношенко М. Ю.^{1,3}

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

²*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*

³*ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия*

Актуальность. На разных стадиях лечения около половины пациентов с раком предстательной железы (РПЖ) получает гормональную терапию. Для достижения кастрационных значений тестостерона применяют комплексную терапию, называемую максимальной андрогенной блокадой (МАБ). Основным осложнением МАБ является развитие устойчивости опухоли к проводимому лечению в 100% случаев в течение 5 лет (среднее время 1-3 года) и формирование кастрационно-резистентного фенотипа (КРРПЖ), который характеризуется неблагоприятным прогнозом - выживаемость таких пациентов составляет 8-45 месяцев.

Цель. Разработка панели для диагностики КРРПЖ на основе оценки уровня экспрессии 14 различных микроРНК (miR-19b, 22, -30e, -31, -92a, -125b, -144, -200b, -205a, -222, -375, -378, -425, -660) в составе внеклеточных везикул (ВВ) и бесклеточной фракции (БкФ) мочи больных гормон-чувствительным раком предстательной железы (ГЧРПЖ), КРРПЖ и здоровых доноров (ЗД).

Материалы и методы. Образцы мочи больных ГЧРПЖ (n=22), КРРПЖ (n=22) и ЗД (n=22) были получены из НМИЦ им. ак. Е.Н.Мешалкина. БкФ была получена последовательным центрифугированием мочи, ВВ – методом агрегации-преципитации. МикроРНК из обеих фракций были выделены с помощью стекловолокнистых сорбентов в присутствии октановой кислоты. Относительная экспрессия микроРНК была оценена методом stem-loop ОТ-TagManПЦР. Статистическая обработка проведена с использованием MedCalc Statistical Software.

Результаты. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил 44 дифференциально-экспрессированные пары микроРНК во фракции ВВ и 32 пары микроРНК во фракции БкФ. Относительная экспрессия 8 пар микроРНК ВВ и 5 пар микроРНК БкФ достоверно отличалась между всеми исследуемыми группами доноров. Пациенты с КРРПЖ достоверно отличались от пациентов с ГЧРПЖ и ЗД по относительной экспрессии 28 и 21 пар микроРНК ВВ, 20 и 21 микроРНК БкФ соответственно. Больные ГЧРПЖ и ЗД характеризовались достоверно различным уровнем экспрессии 14 пар микроРНК ВВ и 3 пар микроРНК БкФ. На основе полученных данных сформированы диагностические панели, способные отделить больных КРРПЖ со 100% специфичностью и чувствительностью.

Выводы. Во фракциях ВВ и БкФ мочи выявлены микроРНК - потенциальные маркеры КРРПЖ. Сформированы панели, включающие по 6 пар из 10 различных микроРНК, позволяющие достоверно разделить группы больных ГЧРПЖ и КРРПЖ, а также группы ЗД и КРРПЖ, измеряя концентрации микроРНК во ВВ и БкФ мочи.

Влияние терапии рака предстательной железы на динамику уровня микроРНК в составе внеклеточных везикул мочи

Шутко Е. В.¹, Саллум Г.¹, Брызгунова О. Е.¹, Мурина Е. А.¹, Остальцев И.А.², Пак С.В.²,
Лактионов П. П.^{1,2}, Коношенко М. Ю.¹

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

²*ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. ак. Е. Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия*

Рак предстательной железы (РПЖ) – одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний среди мужчин. Основными методами лечения РПЖ являются радикальная простатэктомия (РПЭ) и лучевая терапия (ЛТ). Поскольку после такого лечения примерно в трети случаев в течение 5 лет развивается рецидив заболевания, актуален поиск молекулярных маркеров для оценки эффективности терапии. Одним из наиболее перспективных источников таких маркеров являются внеклеточные везикулы (ВВ) мочи, содержащие микроРНК. Аберрантная экспрессия микроРНК наблюдается как при развитии онкозаболеваний, так и после терапии. Исходя из этого, оценка уровня экспрессии микроРНК может быть использована в диагностических и прогностических целях.

Целью исследования является анализ динамики экспрессии микроРНК ВВ мочи у больных РПЖ после РПЭ и ЛТ с точки зрения поиска перспективных прогностических маркеров.

Для исследования использовали образцы мочи 18 здоровых доноров, 22 больных РПЖ до и после РПЭ и 10 больных РПЖ до и после ЛТ (через 3, 6 и 12 месяцев), полученные из НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина. ВВ были выделены из образцов мочи методом агрегации-преципитации; из полученной фракции ВВ выделены микроРНК. Данные о концентрации 14 микроРНК, вовлеченных в механизмы развития РПЖ, получены методом ОТ-ТaqMan-ПЦР.

С использованием дисперсионного анализа выявлены 22 и 40 пар микроРНК, концентрация которых достоверно изменилась после РПЭ и ЛТ соответственно. Были выявлены паттерны динамики относительной экспрессии микроРНК, характерные для обоих видов терапии. Изученные пары микроРНК были разделены на группы в зависимости от направления изменения уровня экспрессии после терапии и различиями между уровнями экспрессии микроРНК до лечения и через год после лечения. Анализ данных показал, что основной интерес с точки зрения оценки эффективности терапии представляют собой 10 и 27 пар микроРНК, относительная экспрессия которых после РПЭ и ЛТ соответственно приблизились к таковой у здоровых доноров, в том числе 5 универсальных пар, которые подходят для оценки эффективности и РПЭ, и ЛТ.

Таким образом, описана годовая динамика уровня исследованных микроРНК после РПЭ и ЛТ, выявлены пары микроРНК – потенциальные маркеры эффективности РПЭ и ЛТ. Оценка эффективности терапии РПЖ путем анализа относительной экспрессии выявленных микроРНК, изменяющих свою экспрессию после терапии, представляет собой потенциально ценный прогностический инструмент.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ №23-25-10026 в рамках поддержанного Правительством Новосибирской области проекта 0000005406995998235120582/ № р-45.

Идентификация белков экзосом, вовлеченных в прогрессирование карциномы молочной железы

Шефер А. А.^{1,2}, Яньшолле Л. В.³, Григорьева А. Е.¹, Тамкович С. Н.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

³ *Институт «Международный Томографический Центр» СО РАН, Новосибирск, Россия*

Экзосомы – внеклеточные везикулы с диаметром от 30 до 150 нм, на поверхности которых присутствуют тетраспаныны CD9, CD63 и CD81. Экзосомы выделяются всеми клетками организма, причем при патологических состояниях их концентрация в биологических жидкостях увеличивается, а также изменяется их состав, что может быть использовано для малоинвазивной диагностики новообразований.

Для идентификации белков были получены экзосомы из 2 клеточных линий псевдо-нормальных эпителиоцитов молочной железы, 3 линий, имитирующих люминальный А подтип, 1 линии, имитирующей люминальный В подтип, 1 линии, имитирующей HER2+ подтип и 4 линий, имитирующих трижды негативный подтип РМЖ. Экзосомы были охарактеризованы трансмиссионной электронной микроскопией, трековым анализом и проточной цитофлуориметрией. Анализ высоко-представленных белков экзосом проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

В составе экзосом кондиционной среды 11 клеточных линий выявлено суммарно 559 белков. Методом сравнительного протеомного анализа выявлены значительные различия в белковом составе экзосом клеточных линий различных молекулярных подтипов РМЖ и псевдо-нормальных эпителиоцитов. В частности, общими для псевдо-нормальных клеточных линий и линий карциномы молочной железы являлись 42 белка. С помощью базы данных Reactome было выявлено, что в составе опухолевых экзосом повышается содержание белков, вовлеченных в репарацию, трансляцию и процессинг РНК. Также в составе экзосом, секретлируемых клетками карциномы молочной железы, выявлено повышенное содержание белков, вовлеченных в катаболизм липидов и белков, являющихся участниками цепи переноса электронов. В составе экзосом крови выявлены перспективные маркеры РМЖ: универсальные биомаркеры РМЖ (n=3), биомаркеры люминальных подтипов (n=4), биомаркеры люминального А подтипа (n=4), биомаркер HER2+ подтипа, биомаркеры трижды негативного подтипа (n=3). Выявленные различия в протеоме экзосом с клеточным протеомом различных линий (база данных Human Protein Atlas), имитирующих подтипы рака молочной железы, является дополнительным подтверждением направленного сортирования белков при созревании экзосом.

Регуляция клеточных систем редактирования для контроля над патологическими состояниями

Нуклеосома как барьер для репарации ДНК

Кутузов М. М., Белоусова Е. А., Украинцев А. А., Кургина Т. А., Лаврик О. И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Молекулы ДНК используются клетками для хранения и реализации генетической информации. Точная регуляция процессов репарации ДНК – один из ключевых элементов в обеспечении сохранности генетической информации. В зависимости от типа повреждения ДНК реализуется один из пяти основных механизмов репарации ДНК: эксцизионная репарация нуклеотидов, эксцизионная репарация оснований ДНК, гомологичная рекомбинация, нехомологичное соединение концов ДНК, мисматч репарация.

Сохранность генетической информации также обеспечивается за счет «системы хранения» ДНК. В клетках эукариот ДНК преимущественно присутствует в форме хроматина. Хроматин в живой клетке является динамичной структурой, что необходимо для реализации метаболических процессов. Важное значение имеет как степень компактизации хроматина, так и его пространственная укладка. В клетке существует несколько механизмов регуляции степени компактизации ДНК, таких как химические модификации компонентов нуклеосом или действие белков-ремоделлеров хроматина. Базовым элементом хроматина является нуклеосома - нуклеопротеидный комплекс, состоящий из восьми коровых гистонов и ДНК. Таким образом, свойства хроматина в значительной степени определяются структурой нуклеосомы, поэтому важно понимать, как может регулироваться процесс репарации ДНК в составе нуклеосомы.

В числе систем репарации ДНК эксцизионная репарация оснований (BER) осуществляет исправление повреждений, которые не приводят к значительным искажениям структуры двойной спирали ДНК. Такие повреждения в ДНК встречаются очень часто, поэтому регуляция этой системы репарации представляет особый интерес. Одним из регуляторных механизмов BER является поли(ADP-рибозил)ирование (PARилирование) – перенос молекул ADP-рибозы на молекулы-мишени. Реакция синтеза PAR осуществляется белками семейства поли(ADP-рибоза)полимераз (PARP), из числа которых в регуляции BER задействованы PARP1 и PARP2. Несмотря на многочисленные исследования, остаются вопросы, как BER регулируется белками PARP и как распределяются роли между PARP1 и PARP2.

В нашей работе мы исследовали влияние PARP1, PARP2 и PARилирования на активность основных ферментов BER, таких как APE1, ДНК-полимеразы β и ДНК-лигазыIII α в нуклеосомном контексте. В ходе работы были реконструированы модельные нуклеосомы с повреждением ДНК, специфичным для процесса BER, в заданном положении. На основе полученных и литературных данных мы предполагаем, что вклад в регуляцию BER посредством PARилирования на начальных стадиях преимущественно определяется PARP1, а на заключительных стадиях увеличивается вклад PARP2.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 22-74-10059.

Создание колориметрических систем детекции белка DKK-1 на основе аптамеров

Шатунова Е.А.¹, Королев М.А.², Воробьева М.А.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

Сывороточный белок Dickkopf-1 (DKK-1) – один из ингибиторов каскада сигнального пути Wnt, который задействован в дифференцировке стволовых клеток, эмбриональном развитии скелета и регуляции костного метаболизма. Этот белок рассматривают в качестве возможного маркера для онкологических заболеваний, в том числе рака молочной железы и гепатоцеллюлярной карциномы, нарушений костного метаболизма при нейродегенеративных заболеваниях и сахарном диабете. В последнее десятилетие DKK-1 вызывает также растущий интерес как маркер структурных повреждений при системных воспалительных заболеваниях (анкилозирующего спондилита (АС), ревматоидного и псориатического артрита). В частности, Wnt-сигнальный путь и белок DKK-1 являются ключевыми в регуляции костного метаболизма, который определяет направление развития АС. Кроме того, DKK-1 сейчас привлекает внимание как потенциальная терапевтическая мишень в лечении указанных выше заболеваний.

При создании диагностических сенсоров одним из вариантов лигандов для связывания DKK-1 или терапевтических ингибирующих агентов являются аптамеры – синтетические одноцепочечные РНК или ДНК, связывающие свои специфичные мишени с высоким сродством и селективностью. Возможность химического синтеза нуклеиновых кислот обеспечивает воспроизводимость свойств аптамеров и систем на их основе.

В нашей работе для получения аптамеров к DKK-1 был использован направленный отбор из комбинаторной ДНК-библиотеки, содержащей участки чередования пиримиди-пуринов в комбинаторной области. После 4 раундов *in vitro* селекции, секвенирования, анализа, химического синтеза и скрининга аффинности кандидатов была получена серия новых высокоаффинных ДНК-аптамеров DK1, DK2, DK3, DK4 со значениями констант диссоциации в диапазоне 1.3-3.7 нМ. На их основе была также синтезирована и охарактеризована серия укороченных вариантов аптамеров DK1, DK2, DK4.

Полученные аптамеры были опробованы при создании систем колориметрической детекции DKK-1. Показано, что в модельных условиях сэндвич-система формата «аптамер/антитело» позволяет определять DKK-1 в диапазоне 0.156-10 нг/мл. Показана также возможность использования систем такого типа для количественного определения уровня DKK-1 в образцах сыворотки крови от пациентов с АС и здоровых доноров.

Полученные аптамеры могут быть использованы в качестве компонентов диагностических систем детекции DKK-1, а также представляют собой потенциальные таргетные ингибиторы функциональной активности данного белка.

Исследование было поддержано грантом РНФ и правительства Новосибирской области № 22-15-20050.

Влияние поли(ADP-рибоза)полимераз 1, 2 и 3 на структуру нуклеосом

Украинцев А. А.¹, Кутузов М. М.¹, Белоусова Е. А.¹, Лаврик О. И.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Фундаментальной единицей хроматина является нуклеосома. Исследования многих биохимических процессов проводили с использованием свободных ДНК-субстратов. Нуклеосома - нуклеопротеид, в котором молекула ДНК обёрнута вокруг гистонов. Такое строение может препятствовать свободному взаимодействию различных белков с ДНК в составе нуклеосомы.

Изучение механизмов репарации ДНК - актуальное научное направление в мире. Эксцизионная репарация оснований (BER) - один из ключевых механизмов поддержания целостности генома. Огромное количество опубликованных научных данных установили, что белки поли(ADP-рибоза)полимераз (PARP): PARP1, PARP2 и PARP3, играют важную роль в регуляции процесса BER. В ответ на повреждение молекулы ДНК, три белка катализируют перенос остатка ADP-рибозы на белки-мишени. Эта посттрансляционная модификация регулирует различные метаболические процессы в клетке.

Для исследования функционирования BER на нуклеосомных субстратах, требуется изучить природу взаимодействия белков PARP с нуклеосомой в контексте процесса BER. В работе была измерена аффинность белок-нуклеиновых комплексов, содержащих ДНК без повреждений, ДНК с АП-сайтом или однонуклеотидной брешью (Gap) как в составе нуклеосомы, так и в форме свободной ДНК. Проведено исследование топологии комплексов нуклеосома-PARP1/PARP2/PARP3 с использованием боргидридной сшивки и метода футпринтинга. С применением атомно-силовой микроскопии проанализировано взаимодействие ДНК-зависимых PARP с модельной нуклеосомой, а также изучены геометрические параметры модельной нуклеосомы и нуклеосомы в комплексе с PARP. Полученные результаты продемонстрировали, что PARP1 и PARP2 оказывают незначительное воздействие на нуклеосому, в то время как PARP3 стабилизирует и уплотняет нуклеопротеидный комплекс.

1. Ukraintsev, A. A., Belousova, E. A., Kutuzov, M. M., & Lavrik, O. I. (2022). Study of Interaction of the PARP Family DNA-Dependent Proteins with Nucleosomes Containing DNA Intermediates of the Initial Stages of BER Process. *Biochemistry. Biokhimiia*, 87(4), 331–345. <https://doi.org/10.1134/S0006297922040034>

2. Ukraintsev, A., Kutuzov, M., Belousova, E., Joyeau, M., Golyshchev, V., Lomzov, A., & Lavrik, O. (2023). PARP3 Affects Nucleosome Compaction Regulation. *International journal of molecular sciences*, 24(10), 9042. <https://doi.org/10.3390/ijms24109042>

Исследование было поддержано грантами РФФ № 22-74-10059

Характеризация компактной термостабильной эндонуклеазы Cas9 из *Anoxybacillus flavithermus*

Матвеева А.М.¹, Рябченко А.С.¹, Петрова В.А.¹, Прохорова Д.В.¹, Журавлев Е.С.¹, Закабунин А.И.¹, Тикунов А.Ю.¹, Степанов Г.А.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Обнаружение и описание нуклеаз Cas9 из различных микроорганизмов обладает значительным потенциалом для развития геномной инженерии и разработки инструментов геномной терапии, поскольку позволяет более детально рассматривать механизмы редактирования с помощью систем CRISPR, расширяя их применение в биологии и медицине. Подкласс термофильных нуклеаз Cas9 активно пополняется новыми представителями благодаря достижениям в полногеномном секвенировании, позволяющим тщательно изучать геномы микроорганизмов для поиска новых систем CRISPR. На сегодняшний день наиболее известны такие представители термофильных эффекторов Cas9, как ThermoCas9, IgnaviCas9, AceCas9 и др. Данные нуклеазы характеризуются различным температурным диапазоном активности и специфической предпочтительностью к последовательности PAM, поэтому дальнейшее расширение подкласса природных термофильных эндонуклеаз Cas9 представляет интересную и многообещающую задачу. В нашей работе показано конструирование вектора, экспрессирующего в клетках *E.coli* компактную нуклеазу Cas9 (AnoCas9) из термофильного микроорганизма *Anoxybacillus flavithermus*. Очищенный белок AnoCas9 в условиях расщепления плазмидной ДНК *in vitro* демонстрирует нуклеазную активность в диапазоне температур 37-60 °С. Нами также был проведен биоинформатический анализ кассеты CRISPR, найденной в данных полногеномного секвенирования, для предсказания последовательности PAM. Методом расщепления флуоресцентно-меченого двуцепочечного ДНК-субстрата, содержащего рандомизованную последовательность PAM, и последующего разрешения продуктов с помощью генного анализатора, для AnoCas9 удалось установить функциональную последовательность PAM вида 5'-NNNNCDAA-3'. Анализ гомологии AnoCas9, а также наблюдаемые в экспериментах *in vitro* свойства данного белка демонстрируют его родство с семейством компактных термофильных нуклеаз GeoCas9. Помимо расширения арсенала доступных нуклеаз AnoCas9 является перспективным кандидатом для использования в областях геномной инженерии и диагностики, требующих присутствия термостабильных систем CRISPR/Cas, например, в редактировании геномов термофильных микроорганизмов, аллель-специфичной изотермальной амплификации и др.

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-1085)

Влияние природных модифицированных нуклеотидов в направляющих РНК на систему CRISPR/Cas9

Прохорова Д. В.¹, Матвеева А. М.¹, Степанов Г. А.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

В настоящее время применяются различные стратегии повышения эффективности системы CRISPR/Cas9. Одним из эффективных и распространенных подходов является модификация направляющих РНК. Хотя химические модификации направляющих РНК широко изучены, встречающиеся в природе модификации РНК напротив остаются практически не исследованными.

В данной работе было исследовано влияние природных модифицированных нуклеотидов: N6-метиладенозина (m6A), 5-метилцитозина (m5C), псевдоуридина (Ψ) и метилпсевдоуридина (m1Ψ) на активность системы геномного редактирования CRISPR/Cas9. В ходе работы были получены серии sgРНК и tracrРНК с разной глубиной природных модифицированных мономеров, и было установлено, что оптимизация времени реакции и глубины модификации направляющих РНК позволяет достичь наибольшей эффективности гидролиза модельных ДНК-субстратов. Кроме того, с использованием FAM-меченных ДНК-дуплексов были рассчитаны кинетические параметры и коэффициенты специфичности. Было показано, что замена канонических нуклеотидов на их модифицированные аналоги в направляющих РНК приводит к повышению специфичности системы CRISPR/Cas9 *in vitro* по сравнению с немодифицированным вариантом. Также было выявлено, что систему CRISPR/Cas9 с модифицированными направляющими РНК можно использовать для геномного редактирования клеток человека в культуре.

Таким образом, включение природных модифицированных нуклеотидов в структуру направляющих РНК позволяет контролировать активность и повышать специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. Кроме того, систему CRISPR/Cas9 с модифицированными направляющими РНК можно применять в клетках человека.

Исследования выполнены при финансовой поддержке государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122022100238-7.

Особенности селективности и специфичности узнавания и расщепления целевой двуцепочечной ДНК эндонуклеазой Cas9

Ковешникова А. Д.^{1,2}, Баранова С. В.¹

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

²*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Системы редактирования генома, к которым относится CRISPR/Cas, являются одним из ключевых инструментов работы молекулярных биологов. Кроме того, они представляют собой перспективную технологию для использования в области персонализированной медицины.

В системе CRISPR/Cas белок Cas9 осуществляет целенаправленный поиск и двуцепочечный разрыв в молекуле ДНК. Фермент – мультидоменная ДНК-эндонуклеаза, имеющая два нуклеазных домена. Один домен (HNH) расщепляет цепь ДНК, комплементарную последовательности направляющей РНК, второй (RuvC) – домен нуклеазы, отвечает за разрезание некомплемментарной цепи. Точные механизмы узнавания, связывания и расщепления целевой ДНК комплексом Cas9/RNA до конца не известны. Для практического использования системы CRISPR/Cas в медицине необходимо повышение специфичности действия фермента Cas9. Поэтому изучение влияния комплементарности ДНК и РНК на формирование РНК/ДНК-дуплекса, является важной и интересной задачей.

Цель данной работы – изучить каталитическую активность фермента Cas9 в реакции расщепления ДНК на модельных субстратах. Модельные субстраты представляют собой двуцепочечные олигонуклеотиды (55 п.о), содержащие ошибку в области связывания с РНК. Они не содержат мисматчей внутри цепи, однако являются не полностью комплементарными для направляющей РНК.

Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи: выделить и наработать фермент Cas9; подобрать условия для определения константы связывания олигонуклеотида, соответствующего нуклеотидной последовательности sgRNA, с комплексом Cas9/sgRNA; установить различие в гидролизе ДНК-субстратов, имеющих несоответствия комплементарности РНК в различных положениях, комплексом Cas9/sgRNA.

В данной работе был наработан, выделен и охарактеризован фермент Cas9. Методом микротермофореза определена константа связывания контрольного субстрата (двуцепочечный олигонуклеотид, имеющий последовательность полностью комплементарную РНК) с комплексом Cas9/sgRNA. Изучено влияние положения некомплемментарной sgРНК пары оснований в ДНК-субстрате на эффективность работы фермента. Скорости реакции расщепления олигонуклеотидов, содержащих мисматчи внутри цепи, отличается от скорости гидролиза контрольного субстрата. Показано что ферментативная активность комплекса Cas9/sgRNA может проявляться с не полностью комплементарным РНК ДНК-субстратом. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем для улучшения работы CRISPR/Cas – системы.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 20-14-00214.

Новые ингибиторы 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека как регуляторы воспалительного ответа

Мелентьев В. С.¹, Филимонов А. С.²

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

²*Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия*

ДНК живых организмов постоянно подвергается воздействию повреждающих агентов как экзогенного, так и эндогенного характера. Сохранение целостности ДНК обеспечивается различными системами репарации. Одной из основных систем репарации ДНК является система эксцизионной репарации оснований (BER). На начальном этапе BER происходит узнавание и удаление поврежденных оснований ДНК-гликозилазами.

В ответ на воспалительные стимулы клетки организма запускают множество реакций, направленных на устранение причины воспаления и восстановление гомеостаза. Одной из таких реакций является продукция клетками активных форм кислорода, которые дают побочный эффект, окисляя азотистые основания в цепи ДНК. Поскольку гуанин обладает самым низким окислительно-восстановительным потенциалом из всех азотистых оснований, он чаще подвергается окислению со стороны активных форм кислорода с образованием 2,6-диамино-4-оксо-5-формаимидопиримидина (FapyG) и 8-оксогуанина (8-oxoG). В клетках млекопитающих FapyG и 8-oxoG удаляются из ДНК 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой (OGG1). Показано, что животные, нокаутные по гену OGG1, демонстрируют снижение уровня воспалительных реакций в ответ на различные стимулы. Кроме того, показано, что ингибирование OGG1 приводит к снижению экспрессии генов участвующих в развитии воспалительного ответа.

В данной работе исследовано влияние новых ингибиторов OGG1 на экспрессию провоспалительных генов в клетках человека. Для этого был проведен скрининг панели соединений на способность к ингибированию активности OGG1. Была проведена оценка токсичности новых ингибиторов для клеточных линий человека (THP-1, Tig1, A549). Был проведен анализ уровня экспрессии провоспалительных генов (IL1B, IL6, TNF) в этих клетках в условиях стимуляции липополисахаридом в присутствии новых ингибиторов в среде. Установлено, что наличие одного из ингибиторов (SHE-10) в культуральной среде приводит к снижению ответа на липополисахарид на уровне продукции белка и мРНК.

Разработка тераностических конъюгатов на основе альбумина для сочетания химиотерапии с бор-нейтронозахватной терапией

Мэйлин Ван¹, Захарова О. Д.², Аврамчук Т. В.²

¹*Новосибирский государственный университет*

²*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

Бор-нейтронная терапия (БНЗТ) является развивающейся в России методикой терапии раковых опухолей. Не смотря на явные преимущества этого метода, такие как возможность осуществления локального терапевтического воздействия на раковую клетку, для осуществления более эффективной терапии в рамках БНЗТ, необходимы терапевтические конструкции нового типа. Они должны сочетать достаточное количество атомов бора с сигнальной молекулой, позволяющей визуализацию конструкции внутри организма, и химиотерапевтическим остатком, необходимым для комбинации БНЗТ и химиотерапии.

Нами, на платформе человеческого сывороточного альбумина, были созданы терапевтические конструкции, несущие борсодержащие остатки (производные бисдикарболида кобальта и клозо-додекарбората), сигнальные молекулы (Cu5, Cu7, трифторацетильная группы) и химиотерапевтические остатки (аналоги гемцитабина и ингибиторы синтеза тубулина - ауристатинны MMAE и MMAF). Для создания конструкций были задействованы методы «клик»-химии с использованием в качестве линкера полифункционального реагента тиолактона гомоцистеина.

Успешное получение борсодержащих альбуминовых структур было подтверждено различными физико-химическими методами. Токсичность созданных конструкций изучали в отношении клеточных линий глиомы человека.

Работа выполнена в рамках Государственного задания 121031300042-1.

Конъюгаты альбумина как мультимодальные контрастные агенты для магнитно-резонансной и флуоресцентной томографии

Митин Д. Е.^{1,2}, Добрынин С. А.³, Кириллук И. А.³, Чубаров А. С.¹

¹ Институт химической биологии фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

Магнитно-резонансная томография (МРТ) является одним из диагностических методов в медицинской практике и используется для выявления раковых опухолей. МРТ-изображения обладают отличной контрастностью мягких тканей, однако в некоторых случаях определить границы опухоли бывает проблематично. Поэтому в таких случаях используются контрастные вещества (КВ) на основе хелатных комплексов тяжелых металлов, таких как Gd^{3+} , имеющие высокую цену и побочные эффекты. Альтернативой парамагнитным комплексам Gd^{3+} могут служить стабильные нитроксильные радикалы (NIT), контрастирующие так же, как и классические КВ для 1H МРТ. Тем не менее нитроксиды имеют ряд недостатков, для решения которых может быть использован HSA в качестве транспортера молекулярных зондов. Оптимальным диагностическим методом, составляющим тандем с МРТ, является флуоресцентная томография (ФТ) с использованием флуоресцентных КВ. В связи с ограничениями по глубине проникновения излучения в ткани ФТ используется как инструмент визуализации для контроля за ходом операции.

Цель работы — разработка бимодальных безметаллических КВ для визуализации злокачественных опухолей с использованием конъюгатов HSA, NIT и флуоресцентного красителя как для 1H -МРТ, так и для ФТ.

В нашей работе был создан новый подход для получения конъюгатов HSA-NIT, основанный на совместном присутствии тиолактонового и малеимидного производных NIT и их дробном добавлении в реакционную смесь. Показано, что использование данного подхода обеспечивает модификацию HSA до 25 остатков NIT, что подтверждено методами ЭПР и MALDI ToF MS. С помощью метода кругового дихроизма для конъюгатов HSA было показано незначительное уменьшение альфа-спиралей и сохранение бета-листов на уровне нативного белка. При использовании HSA в качестве системы доставки стерически затрудненных NIT удается снизить константы восстановления в сотни раз по сравнению с конъюгатами NIT с дендримерами, что свидетельствует об их пролонгированном действии. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия подтверждено отсутствие образования потенциально токсичных агрегатов. МТТ-тест показал отсутствие цитотоксичности КВ. Значение релаксивности (уровень чувствительности препаратов для МРТ) r_1 для КВ на основе NIT сопоставимо со значением релаксивности препарата Гадовист®, а значение r_2 превышает его. Для подтверждения возможности использования бимодальных конъюгатов в качестве КВ были зарегистрированы фантомные изображения МРТ *in vitro*.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 23-13-00178

Структуры олигомерных форм двух лед-связывающих белков, образующиеся при взаимодействии со льдом

Олейник Г. А.¹, Жданова П. В.¹, Мажорина М. А.², Баранова С. В.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Институт белка РАН, Пущино, Россия*

Лед-связывающие белки (ЛСВ) применимы во многих сферах деятельности человека: медицина, авиация, сельское хозяйство, пищевая промышленность. Эти белки обладают способностью связываться с поверхностью льда и препятствуют росту кристаллов льда. Особенные свойства ЛСВ, например, в пищевой промышленности используются для сохранения качества и вкуса мороженого. В авиации лед-связывающие белки можно использовать для обработки поверхностей против обледенения, в сельском хозяйстве – для повышения морозостойкости посевного материала.

Лед-связывающие белки были открыты в 60-х годах, их обнаружили в различных источниках: рыбах, насекомых, растениях, дрожжах, бактериях. Несмотря на возрастающий интерес в использовании этих объектов, структурно-динамические механизмы взаимодействия ЛСВ при связывании с поверхностью льда остаются неизвестными.

ЛСВ различны по структуре и массе, но все обладают антифризной активностью. Целью данного исследования было изучение образования олигомерных форм двух рекомбинантных лед-связывающих белков, один из которых в природе обнаружен у рыб *Muchocephalus octodecemspinosus* (ISP LS-12), а второй – у жуков *Rhagium inquisitor* (RiAFP). Для этого необходимо было решить следующие задачи: подтвердить (определить) вторичные структуры белков методом кругового дихроизма; с помощью метода масс-спектрометрии установить наличие олигомерных форм; предложить возможные структуры олигомеров с помощью веб-сервисов GalaxyWeb и AlphaFold2.

В результате данной работы методом масс-спектрометрии MALDI-TOF были охарактеризованы два лед-связывающих белка. Вторичная структура подтверждена методом кругового дихроизма. Установлено, что масса ISP LS-12 составляет 17,5 кДа и у него преимущественно α -спиральная структура. Масса RiAFP – 12,5 кДа и β -складчатая структура. В растворах белков обнаружены димеры, тримеры, тетрамеры и олигомеры более высокого порядка.

Можно предположить, что наличие олигомеров в растворе лед-связывающих белков, способствует лучшему связыванию с поверхностью льда. Установление оптимальной структуры важно для понимания механизмов взаимодействия этих белков со льдом.

Исследование было поддержано проектом базового бюджетного финансирования 0245-2021-0002 и РФФ № 23-24-00256.

Гидролиз олигодезоксирибонуклеотидов на поверхности ДНК-микрочипов и в растворе каталитическими анти-ДНК-антителами при системной красной волчанке

Новикова Т. С.^{1,2}, Ермаков Е. А.^{1,2}, Костина Е. В.¹, Синяков А. Н.¹, Сизиков А. Э.¹, Невинский Г. А.¹, Бунева В. Н.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Введение. Системная красная волчанка (СКВ) – аутоиммунное заболевание, характеризующееся выработкой антител к ДНК и к другим антигенам собственного организма. Анти-ДНК антитела используются для диагностики и мониторинга активности заболевания. Помимо высокоспецифичных анти-ДНК антител у пациентов с аутоиммунными заболеваниями обнаруживаются менее аффинные антитела, обладающие каталитической активностью. Однако специфичность каталитических антител к ДНК до сих пор остаётся неизвестной. Связывание ДНК с поверхностью, например клеточной мембраной, также может влиять на распознавание и гидролиз антителами.

Цель исследования. Изучить специфичность гидролиза модельных олигодезоксирибонуклеотидов, иммобилизованных на поверхности микрочипа, и в растворе каталитическими антителами при СКВ.

Материалы и методы. В настоящей работе использовали препараты IgG пациентов с СКВ (n = 5 человек), находящихся в активной стадии заболевания, и здоровых доноров (n = 5), а также восемь модельных олигодезоксирибонуклеотидов (ОДН). Для оценки степени гидролиза модельных ОДН, иммобилизованных на поверхности микрочипа, проводили серию реакций в 1–3 повторах. Степень гидролиза регистрировали по изменению флуоресцентного сигнала при помощи сканера ScanArray Express 2.0 (Perkin Elmer, Родгау, Германия). Для оценки степени гидролиза модельных ОДН в растворе проводили серию реакций в 2 повторах. Продукты реакции анализировали денатурирующим гель-электрофорезом в 20% полиакриламидном геле и детектировали с помощью лазерного сканера Amersham Typhoon (Cytiva, Германия). В качестве положительного контроля в каждом из методов использовалась ДНКазы I (New England Biolabs, США).

Результаты. Антитела пациентов с СКВ гидролизовали ОДН, как в растворе, так и на поверхности микрочипа, с большей эффективностью по сравнению с антителами здоровых доноров. Эффективность гидролиза и специфичность к определённым мотивам отличалась для ОДН, находящихся в растворе и иммобилизованных на поверхности микрочипа. Также показан более эффективный гидролиз ОДН в растворе, чем иммобилизованных на поверхности. В опыте с ДНКазой I наиболее эффективно гидролизовался ОДН (AT)₅, способный образовывать дуплексы в растворе, что соответствует литературным данным.

Выводы. Полученные данные указывают на образование каталитических антител при СКВ, распознающих специфические мотивы ДНК. Кроме того, можно предположить, что антитела по-разному распознают и гидролизуют ДНК в растворе и иммобилизованную на поверхности.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 23-15-00357

Разнообразие каталитических активностей антител крови мышей C57BL/6 при развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита

Урусов А. Е., Невинский Г. А.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН,
Новосибирск, Россия*

Известно, что при развитии аутоиммунных заболеваний в результате изменения профиля дифференцировки стволовых клеток костного мозга происходит образование антител, проявляющих разнообразные каталитические активности, – абзимов. Появление абзимов может достоверно свидетельствовать о начале аутоиммунного заболеваний, а повышение их активности связано с развитием патологии и является индикатором интенсивности патологического процесса. Важной частью исследований аутоиммунных заболеваний является изучение активности антител в биологических жидкостях на разных этапах развития патологии.

Целью работы было изучение изменений активности антител плазмы крови мышей линии C57BL/6, склонных к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ), являющегося моделью рассеянного склероза человека, в процессе спонтанного развития ЭАЭ и после иммунизации мышей с помощью МОГ (миелин-олигодендроцитарного гликопротеина) и комплекса ДНК с пятью гистонами.

С помощью аффинной хроматографии были выделены гомогенные препараты антител из крови мышей линии C57BL/6, не иммунизированных и иммунизированных с помощью МОГ и комплекса ДНК с гистонами. Было показано, что уровень каталазной, амилазной, РНКазной, фосфатазной и протеолитической активностей данных антител существенно увеличивается при спонтанном развитии ЭАЭ, а иммунизация мышей указанными антигенами приводит к ещё более сильному возрастанию активностей абзимов.

Особое внимание было уделено анализу относительной активности и субстратной специфичности антител против пяти индивидуальных гистонов (H1, H2A, H2B, H3 и H4) и основного белка миелина (ОБМ) в гидролизе этих гистонов и ОБМ. Было показано, что, в отличие от абзимов к другим белкам, такие абзимы обладают полиреактивностью в комплексообразовании и перекрестной каталитической активностью. Антитела против каждого из индивидуальных гистонов эффективно гидролизуют каждый из этих гистонов и ОБМ и наоборот – антитела против ОБМ расщепляют каждый из гистонов.

С помощью MALDI-спектрометрии были получены данные о специфических сайтах гидролиза пяти гистонов антителами против ОБМ и каждого из гистонов. Было впервые показано, что репертуар и количество сайтов гидролиза каждого из гистонов антителами против гистонов и ОБМ очень сильно зависит от использованного антигена (МОГ или комплекс ДНК-гистоны) и стадии развития ЭАЭ: начало (7-8 дней), острая фаза (18-20 дней) и ремиссия (более 25-30 дней). Иммунизация мышей МОГ и комплексом ДНК с гистонами приводит к появлению в крови антител, гидролизующих гистоны по сайтам, набор и число которых сильно отличается от таковых при спонтанном развитии ЭАЭ.

Исследование было поддержано грантом РФФ 22-15-00103.

Влияние фосфорилгуанидиновой модификации в праймерах на процессивность Taq-полимеразы

Булгакова А. Е.¹, Дмитриенко Е. В.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Аналоги и производные нуклеиновых кислот служат молекулярными инструментами для биологических исследований, а также для молекулярной и клинической диагностики. Введение химических модификаций в состав олигонуклеотидов позволяет направленно изменять их структуру, свойства, взаимодействие с биологически активными соединениями. Олигонуклеотиды, содержащие химические модификации часто обладают улучшенными физико-химическими и биологическими свойствами.

Ранее в ИХБФМ СО РАН были разработаны фосфорилгуанидиновые производные олигонуклеотидов (ФГО), обладающие нейтральным зарядом. Полученные ранее результаты показывают эффективность использования ФГО при изучении работы ферментативных систем, а также для практических целей при ПЦР-диагностике.

Согласно рентгеноструктурному анализу, в сайт связывания Taq ДНК-полимеразы входит как матричная цепь, так и удлиняемый праймер, в связи с чем структура праймеров в значительной степени определяет эффективность протекания полимеразной цепной реакции. Наибольшее влияние на выход полноразмерного продукта оказывают модификации в зоне сайта связывания фермента с ДНК-дуплексом (с первого по пятый нуклеотид на 3'-конце праймера). Именно они вовлечены в связывание с аминокислотными остатками активного центра фермента. Вероятно, поэтому любые модификации, вносимые в эту часть праймера, оказывают заметное влияние на эффективность действия Taq ДНК-полимеразы. Наличие модификации за пределами этого района сказывается на эффективности элонгации в меньшей степени.

Таким образом, в данной работе проведено исследование влияния положения и количества фосфорилгуанидиновых остатков в праймерной цепи на эффективность Taq ДНК-полимеразы на модельной системе, представленной 30-звенной матрицей и 20-звенными удлиняемыми праймерами. Было проанализировано 38 вариантов удлиняемых праймеров, содержащих фосфорилгуанидиновые остатки как в зоне связывания с ферментом, так и за его пределами.

Полученные результаты были сведены в общую матрицу и обработаны в программе STATISTICA 10 (Statsoft). Получена достоверная корреляция между экспериментальными и расчетными данными. Предсказано влияние модификации на эффективность выхода полноразмерного продукта удлинения. Также проведено исследование совместного влияния в составе праймера фосфорилгуанидиновой модификации и наличия в соседнем положении переменного варианта мисматча на процессивность taq-полимеразы в процессе аллель-специфической полимеразной цепной реакции. Проанализированы результаты секвенирования полученных ПЦР-продуктов.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 22-24-00996.

**Противоопухолевые препараты: от
низкомолекулярных веществ до терапевтических
нуклеиновых кислот**

Легочный фиброз как результат острого воспаления: молекулярные механизмы, прогностические маркеры и терапевтические мишени

Савин И. А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

Легочный фиброз является хроническим прогрессирующим заболеванием легких, которое приводит к нарушению нормальной архитектуры легких и дыхательной недостаточности. Причиной развития легочного фиброза в подавляющем большинстве случаев является предшествующее острое воспаление в легких различной этиологии, которое не разрешилось вовремя и привело к чрезмерному отложению компонентов внеклеточного матрикса и разрастанию фибротической ткани в легких. Несмотря на большой объем исследовательских работ, посвященных изучению легочного фиброза, эффективных способов лечения данной патологии в настоящее время не существует. Данный факт обуславливает острую необходимость в изучении молекулярных механизмов, лежащих в основе перехода от острого воспаления к легочному фиброзу, а также в поиске новых молекулярных маркеров и терапевтических мишеней, которые позволили бы предотвратить развитие легочного фиброза. В данном докладе будут освещены роль острого воспалительного процесса в легких в развитии легочного фиброза, патоморфологические характеристики фиброза легких, известные молекулярные механизмы, участвующие в развитии легочного фиброза, прогностические маркеры, терапевтические мишени и потенциальные подходы по подавлению перехода от острого воспаления к легочному фиброзу. В качестве примера будут приведены результаты исследования по поиску потенциальных генов-регуляторов перехода от острого воспаления к легочному фиброзу на модели острой астмы и пост-астматического фиброза.

1. Savin I.A., Markov A.V., Zenkova M.A., Sen'kova A.V. Asthma and post-asthmatic fibrosis: a search for new promising molecular markers of transition from acute inflammation to pulmonary fibrosis. Biomedicines
2. Savin I.A., Zenkova M.A., Sen'kova A.V. Pulmonary fibrosis as a result of acute lung inflammation: molecular mechanisms, relevant in vivo models, prognostic and therapeutic approaches. Int J Mol Sci

Данное исследование было поддержано грантом РНФ №19-74-30011.

Разработка паттерна мезильных модификаций для малых интерферирующих РНК

Бачкова И.К.^{1,2}, Жуков С.А.¹, Купрюшкин М.С.¹, Зенкова М.А.¹, Черноловская Е.Л.¹, Черников И.В.¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Малые интерферирующие (siРНК) – перспективные терапевтические препараты, подавляющие экспрессию генов по механизму РНК-интерференции (РНКi). Для защиты от расщепления нуклеазами организма в состав siРНК включают химические модификации. Мезильная модификация (μ) является перспективным аналогом широко используемой в составе siРНК фосфотиатной модификации (PS), поскольку она обеспечивает большую нуклеазоустойчивость и не проявляет токсичности. В данной работе мы проводили *in vitro* скрининг siРНК, содержащих различные конфигурации мезильных модификаций, для определения оптимального паттерна их расположения в составе siРНК.

На первом этапе работы мы определяли возможность использования мезильной модификации в качестве прямой замены PS. Для этого мы сравнили активность siРНК, содержащих на концах обеих цепей две PS-модификации или две μ -модификации. Относительную активность siРНК (Отн_А) рассчитывали как отношение IC₅₀ для контрольной siРНК без модификаций фосфата к IC₅₀ для siРНК с модификациями фосфата. Концевые PS в обеих цепях siРНК ухудшали процесс РНКi незначительно (Отн_А = 0.57), а аналогичный паттерн мезильных модификаций ингибировал РНКi (Отн_А = 0.007). Ингибирующее влияние сохранялось при использовании концевых μ -модификаций только в антисмысловой цепи (Отн_А = 0.01) и пропадало при использовании только в смысловой цепи (Отн_А = 1.5).

Для определения влияния положения μ -модификаций на активность siРНК, мы провели скрининг siРНК, содержащих одну μ -модификацию в 7 различных позициях смысловой цепи и 10 позициях антисмысловой цепи. Модификации во всех протестированных положениях смысловой цепи и в 8 положениях антисмысловой цепи не нарушали активность siРНК (Отн_А = 0.93-2.5). Модификации в 1-м и 3-м положении снижали Отн_А до 0.12 и 0.66 соответственно.

Для определения возможных эффектов взаимодействия между μ -модификациями мы исследовали активность siРНК, содержащих некоторые комбинации μ -модификаций. Относительная активность siРНК, содержащих по одной μ -модификации в смысловой и антисмысловой цепи, снижалась до 0.09 только если в антисмысловой цепи было модифицировано 1-е положение, в остальных случаях активность не изменялась (Отн_А = 0.7-1.6). siРНК, содержащая μ -модификации в 17 из 20 позиций смысловой цепи, также не теряла активность (Отн_А = 1.3).

Таким образом, в большинстве положений siРНК μ -модификации не нарушают активность siРНК *in vitro* и это свойство сохраняется при использовании множественных модификаций. Можно ожидать, что оптимизированный на основе этих данных паттерн мезильных модификаций увеличит длительность биологического действия siРНК *in vivo*.

Исследование было поддержано грантом РФФ 19-14-00251.

Производное усниновой кислоты усиливает противоопухолевое и антиметастатическое действия топотекана в отношении карциномы легкого Льюис *in vivo*

Корниенко Т. Е.¹, Захаренко А. Л.¹, Николин В. П.², Попова Н. А.^{2,4}, Охина А. А.^{3,4}, Рогачев А. Д.^{3,4}, Филимонов А. С.³, Лузина О. А.³, Салахутдинов Н. Ф.^{3,4}, Лаврик О. И.^{1,4}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия*

² *Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия*

³ *Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, г. Новосибирск, Россия*

⁴ *Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия*

Топотекан – цитостатический противоопухолевый препарат, широко применяемый в клинике. Фармакологическое действие топотекана основано на стабилизации комплексов топоизомеразы 1-ДНК (Top1-ДНК), что приводит к накоплению повреждений ДНК и дальнейшей гибели опухолевой клетки. Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) – фермент репарации ДНК, удаляющий различные ковалентные аддукты с 3'-конца ДНК. В частности, Tdp1 нейтрализует действие топотекана. Таким образом, применение ингибиторов Tdp1 в качестве вспомогательной терапии является многообещающей стратегией при лечении онкологических заболеваний.

Ранее мы обнаружили, что производное усниновой кислоты ОЛ9-116 является эффективным ингибитором Tdp1 ($IC_{50}=0,16 \mu M$). ОЛ9-116 усиливает действие топотекана как *in vitro*, так и *in vivo*. Проведя изучение фармакокинетики ОЛ9-116 в крови здоровых мышей, нами было установлено, что внутрибрюшинное введение вещества значительно повышает его биодоступность и позволяет снизить дозу в 30 раз по сравнению с внутривенным введением в дозе 150 мг/кг. При этом максимальная концентрация вещества в крови после внутрибрюшинного введения в дозе 5 мг/кг (максимальная концентрация достигается спустя 2 часа после введения) практически совпадает с таковой, наблюдающейся при внутривенном введении в дозе 150 мг/кг.

Целью данной работы является изучение противоопухолевого и антиметастатического действия ОЛ9-116 в сниженной дозе (5 мг/кг) в монорежиме и в комбинации с топотеканом, введенным одновременно и с совмещением пиков концентраций веществ в крови (с учетом данных фармакокинетики), в отношении карциномы легкого Льюис. В исследовании были использованы мыши-самцы линии C57BL/6. Животные были разделены случайным образом на 6 групп: 1 группа – интактный контроль; 2 группа – ДМСО + Tween-80; 3 группа – топотекан; 4 группа – топотекан + ОЛ9-116 (одновременно); 5 группа – ОЛ9-116 + топотекан (через 2 часа); 6 группа – ОЛ9-116. Действие препаратов оценивали в конце эксперимента по весу и размеру первичного опухолевого узла, числу метастазов в легких.

По окончании эксперимента мы обнаружили, что более эффективной в отношении размера, веса опухолевого узла и количества метастазов оказалась комбинация ОЛ9-116 и топотекана при совмещении пиков концентраций веществ в крови по сравнению с остальными группами.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 21-14-00105

Искусственные внеклеточные везикулы как средства доставки терапевтических нуклеиновых кислот

Ощепкова А. Л.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия*

Использование внеклеточных везикул (ВВ) для доставки терапевтических нуклеиновых кислот (ТНК) стало вызывать обширный интерес в последние годы. Предполагается, что ВВ способны переносить свое содержимое на значительные расстояния внутри живого организма, а также могут специфично взаимодействовать с их клетками-мишенями. Однако, сложная процедура выделения и очистки ВВ, наряду с отсутствием высокоэффективных методов их загрузки терапевтическими средствами, существенно ограничивают их практическое применение. В то же время, стали активно развиваться подходы, позволяющие создавать функциональные аналоги ВВ, например, с помощью обработки клеток актин-дестабилизирующим агентом, цитохалазином В.

Цитохалазин В-индуцированные мембранные везикулы (ЦХвМВ) отделяются от поверхности клеток после их кратковременной инкубации с цитохалазином В и последующего механического встряхивания. Ранее мы показали, что ЦХвМВ могут обеспечивать накопление олигонуклеотидов в клетках человека и мыши. В данной работе мы оценили способность ЦХвМВ к функциональной доставке различных ТНК: малой интерферирующей РНК (siRNA), направленной к гену *MDR1*, интерферон-индуцирующей иммуностимулирующей РНК (isRNA), плазмидной ДНК (пДНК) и модифицированных миРНК-21-направленных антисмысловых олигонуклеотидов (ASO-21).

Оказалось, что ЦХвМВ не обеспечивают функциональную доставку коротких РНК-дуплексов (siRNA и isRNA) в клеточных линиях KB-3-1 или K562, стабильно экспрессирующих белок MDR1-GFP, в клетках меланомы мыши B16, а также в мышцах линии СВА. При изучении доставки пДНК, экспрессирующей белок GFP, с помощью ЦХвМВ, было обнаружено, что эффективность доставки (и экспрессии GFP) определяется типом клеток: в клетках KB-3-1 не наблюдалась доставка пДНК, в клетках B16 доставка проходила на низком уровне, тогда как в клетках НЕК 293 экспрессия GFP наблюдалась в 20% клеток в популяции. Кроме того, комплексы пДНК с ЦХвМВ удалось визуализировать в 1% агарозном геле.

Наиболее эффективно ЦХвМВ доставляли в клетки меланомы B16 полностью модифицированный N-(метансульфонил)фосфорамидный (мезильный) антисмысловый олигонуклеотид (ASO-21). Было установлено, что, после доставки, ASO-21 снижал уровень миРНК-21 в 2 раза, что было близко к эффективности действия ASO-21, доставленного с помощью Lipofectamine 2000. ЦХвМВ-опосредованная внутриклеточная цитоплазматическая локализация ASO-21 была подтверждена методом конфокальной микроскопии.

Таким образом, показано, что ЦХвМВ могут обеспечивать функциональную доставку молекул ДНК различного размера, но не эффективны для переноса коротких двухцепочечных РНК.

Исследование было поддержано грантом РФФИ 19-74-30011.

Нанокompозитные материалы на основе карбоната кальция для улучшенной фармакокинетики терапевтических средств

Попова В.К.¹, Грязнова О. Ю.², Трушина Д.Б.³, Дмитриенко Е.В.¹

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

²*Институт биоорганической химии им. Академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

³*Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,
Москва, Россия*

Наночастицы сопоставимые по размеры с внутренним миром человека широко применяются в биомедицинских исследованиях, особенно в качестве компонентов систем терапии и диагностики.

В настоящем исследовании представлены многообещающие результаты о получении наночастиц карбоната кальция (СаНЧ) и их магнитных нанокompозитов (Fe₃O₄@СаНЧ). Продемонстрирован потенциал полученных материалов в качестве транспортера биологически активных соединений, в частности малых лекарственных молекул.

В первую очередь, были разработаны протоколы получения стабильной суспензии наноразмерных частиц карбоната кальция размером до 200 нм. В ходе адаптации методики, были синтезированы гибридные варианты с магнитным ядром на основе смешанного оксида железа (Fe₃O₄@СаНЧ) размером до 150 нм с концентрацией магнитного ядра от 0,45–4,5 мг/мл. Основываясь на морфологии частиц, их магнитных свойствах, а также стабильности материалов в водных растворах и условиях близких к физиологическим был выбран наилучший кандидат. Варьируя условия взаимодействия СаНЧ и Fe₃O₄@СаСО₃ с модельным терапевтическим средством – доксорубицином (DOX), были получены лекарство содержащие нанокompозиты СаНЧ-DOX Fe₃O₄@СаСО₃-DOX с ёмкостью вплоть до 1900 мкг DOX на 1 мг частиц. Основываясь на эффективности извлечения лекарства из состава нанокompозита, а также ингибирования клеточной активности, было показано, что оптимальное количество DOX 160 мкг/мг.

На клеточных линиях показаны отсутствие токсичности СаНЧ и Fe₃O₄@СаСО₃, а также эффективность ингибирования клеточной активности нанокompозитами с доксорубицином. Более того, для СаНЧ изучена токсичность и биораспределение на модельных животных.

Таким образом, получен новый рН-зависимый инструмент направленного транспорта лекарств и показано, что избыточное связывание лекарства может привести к нецелевому расходованию лекарственного средства и искажению желаемых фармакокинетических профилей.

Исследование было поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН №121031300042-1 и РНФ 21-74-10058.

Разнообразие самособирающихся комплексов РНК: от наноархитектуры до наномашин

Канарская М. А.^{1,2}, Ломзов А.А.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Вторичная и третичная структура нуклеиновых кислот во многом определяют их биологические функции. Ранее в ИХБФМ СО РАН были детально исследованы конкатамерные и самоограниченные ДНК комплексы. Первые формируются парой олигонуклеотидов, которые имеют два попарно-комплементарных участка. Если между ними ввести гибкий линкер, то формируются самоограниченные комплексы. Ранее рассматривали структуры, формируемые олигодезоксирибонуклеотидами. Молекулярность таких комплексов определяли с помощью опенера – короткой последовательности ДНК, комплементарной одному из фрагментов цепи самоограниченного комплекса. В результате взаимодействия такого комплекса и опенера комплекс может разворачиваться, образуя линейную незамкнутую форму. Клозер – короткая последовательность НК, комплементарная опенеру. При добавлении стоппера к раскрытому опенером комплексу, последний должен вновь замкнуться в комплекс такой же молекулярности или более низкой.

Целью данной работы является исследование структуры РНК комплексов, образованных парой олигонуклеотидов и исследование возможности контроля формы и размера комплексов РНК за счет взаимодействия с РНК-опенером и РНК-клозером.

Объектом исследования являлись олигорибонуклеотиды, состоящие из дуплексных участков размером 10 звеньев, соединенных линкерами разной длиной. Методом термической денатурации исследовали термостабильность таких комплексов. Методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях установлена возможность формирования конкатамерных и самоограниченных комплексов. Молекулярность самоограниченных комплексов определяли методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях и доказывали путем анализа их взаимодействия с опенером, содержащим нависание размером пять нуклеотидов,. Далее проводили исследования РНК комплексов при добавлении опенера и клозера. Электрофоретический анализ показал, что при добавлении опенера бимолекулярный комплекс раскрывается в линейную форму, а при добавлении клозера комплекс возвращается в исходное состояние. При аналогичном взаимодействии с более высокомолекулярными комплексами установлено, что при добавлении стоппера к линейной структуре часть комплексов возвращается в исходное положение, часть сворачивается в структуры с большей подвижностью, что соответствует комплексам с меньшей молекулярностью. Таким образом, было показано, что добавление определенных последовательностей НК к самоограниченным комплексам позволяет направленно изменять их молекулярность и геометрию.

Работа выполнена при поддержке проектов РФФИ 20-04-0719 и в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 123021600208-7

Производные олигонуклеотидов для биомедицинских применений

Методы синтеза фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидных производных

Жуков С. А.¹, Купрюшкин М. С.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Синтетические олигонуклеотиды в настоящее время нашли широкое применение в различных областях молекулярной биологии, биотехнологии и медицины. Для терапевтического применения олигонуклеотидов особое значение имеют такие свойства, как устойчивость в биологических средах и эффективность проникновения в клетки, которые достигаются путем введения различных модификаций. На данный момент 18 олигонуклеотидных препаратов уже одобрены организацией FDA (Food and Drug Administration), при этом подавляющее большинство из них основаны на модифицированных олигонуклеотидах. Существует множество путей введения химических модификаций в структуру олигонуклеотидов, некоторые из них требуют сложного многостадийного синтеза реагентов-модификаторов. Однако особый интерес представляют методы введения модификаций, совместимые с автоматическим твердофазным олигонуклеотидным синтезом, и требующие лишь незначительного изменения протоколов и набора используемых реагентов. К данной категории можно отнести модификации межнуклеотидного фосфата, вводимые в условиях альтернативного этапа окисления.

В 2014 г. в ИХБФМ СО РАН был предложен метод получения нового класса олигонуклеотидных производных - фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов, основанный на реакции Штаудингера с участием реакционноспособных диаминокарбенилазидов. Данный метод полностью совместим со стандартным набором реагентов и протоколами, используемыми в твердофазном амидофосфитном синтезе. Возможность высокоэффективного введения модификации в условиях автоматического синтеза позволила создавать разнообразные олигонуклеотидные конструкции, содержащие фосфорилгуанидиновые модификации: как полномодифицированные, так и в сочетании с нативными нуклеотидными звеньями или с другими видами модификаций. В настоящий момент терапевтические средства на основе олигонуклеотидов, содержащих различные фосфорилгуанидиновые модификации, находятся на стадии доклинических испытаний. К важному преимуществу класса ФГ производных можно отнести возможность варьировать вводимые в состав олигонуклеотида функциональные группы [2]. Данная особенность позволяет рассматривать ФГ модификацию не только в качестве инструмента для создания олигонуклеотидных конструкций с полностью или частично электронейтральным остовом, но и в качестве способа функционализации олигонуклеотидов путем введения различных заместителей при гуанидиновом остове.

В данной работе рассматриваются различные подходы к получению ФГО и демонстрируется возможность их применения для введения ФГ модификаций с различным набором заместителей. Описаны методы, основанные на как на введении остатка гуанидина в условиях окислительного аминирования, так и на реакции Штаудингера с участием реакционноспособных органических азидов.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 19-14-00204.

Разработка новых гибких подходов к получению триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов

Жарков Т.Д.,¹ Купрюшкин М.С.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

На данный момент модифицированные олигонуклеотиды являются востребованным и широко применяемым инструментом в различных областях молекулярной биологии, биотехнологии и медицины. Так, например, по состоянию на 2023 год организацией FDA одобрено уже 18 препаратов на основе олигонуклеотидов. Химические модификации в составе НК-конструкций улучшают их критические свойства, важные для применения в терапии или диагностике, такие как, например, эффективность внутриклеточной доставки, гибридизации с мишенью и т.п. Все возрастающее число публикаций по новым типам модификаций НК указывает на актуальность данной тематики. Разработка гибких подходов к введению модификаций, позволяющих тонко регулировать свойства создаваемых конструкций, также представляет интерес.

В данной работе представлены новые гибкие подходы к получению ранее открытых триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, позволяющие тонко регулировать свойства создаваемых производных за счет варьирования вводимых в остов модификации заместителей, а также положения и количества модификаций. В основе подхода лежит реакция Штаудингера с применением компактных 4,6-замещенных 2-азидо-1,3,5-триазинов. С применением подхода получен ряд олигонуклеотидов, в том числе и додецил-содержащие для исследования эффективности их проникновения через клеточную мембрану.

Ключевые слова: модифицированные олигонуклеотиды, реакция Штаудингера, модифицированная фосфатная группа.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-14-00204.

Нуклеотиды с α -фосфатными модификациями: синтез и применение

Новгородцева А. И.¹, Васильева С. В.¹, Ломзов А. А.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия*

Модифицированные нуклеозид-трифосфаты, имеющие хотя бы одну модификацию на α -фосфате, имеют важное значение, потому что после отщепления пирофосфата они включаются в качестве модифицированных монофосфатных субстратов в длинноцепочечные нуклеиновые кислоты с помощью ДНК- или РНК-полимераз. Обширный круг работ в литературе посвящен нуклеотидам с различными альфа-фосфатными модификациями, методам их получения и использования. Эти соединения оказались весьма привлекательными либо незаменимыми для различных применений, таких как получение аптамеров или антисмысловых олигонуклеотидов, в секвенировании, ПЦР и др. Наиболее широко известная альфа-фосфатная модификация-тиофосфатная. Другие, не менее важные модификации (борано-, алкил-, селено-, амино-, имидо-) могут применяться в качестве ингибиторов вирусной обратной транскриптазы, для создания инженерных полимераз, в ПЦР и пиросеквенировании. Помимо традиционной роли в клетках, полученные из этих трифосфатов, модифицированные нуклеиновые кислоты могут являться генетическим материалом различных патогенных вирусов, таких как HIV, герпес, корь, эпидемический паротит и многих других.

Несмотря на то, что первый модифицированный тио-трифосфат был получен еще в 1967 году, многие современные способы получения нуклеотидных аналогов не способны обеспечить достаточное разнообразие и высокие выходы в синтезе различных дезокси- и рибонуклеозид-5'-(α -P)-трифосфатов, поэтому анализ предыдущего опыта и применение новых подходов к синтезу этих соединений является актуальной задачей.

Одним из таких подходов является разработанный недавно в нашей лаборатории метод синтеза нуклеозид-трифосфатов с использованием реакции Штаудингера. Так был получен трифосфат с диметилимидазольной модификацией. Оказалось, что продукт может служить субстратом для ферментативно-катализируемого матрично-независимого синтеза ДНК с помощью терминальной дезоксинуклеотидил трансферазы человека и после присоединения останавливать дальнейшее удлинение цепи в присутствии незащищенной 3'-гидроксильной группы [1]. В настоящее время ведется работа по изучению методов синтеза трифосфатов с объемными гидрофобными бензоазольными модификациями (бензотиазольной, бензоксазольной и бензимидазольной).

1 Vasilyeva S.V., Kuznetsova A.A., Baranovskaya E.E., Kuznetsov N.A., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. Synthesis of the new nucleoside 5'-alpha-iminophosphates using Staudinger reaction //Bioorganic Chemistry. – 2022. – Т. 127. – С. 105987.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 21-64-00017.

Эффективная ПЦР диагностика с новыми фосфорамидными азольными олигонуклеотидами (ФАО)

Барановская Е. Е., Чубаров А. С., Ломзов А. А., Васильева С. В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Одним из широко используемых диагностических методов в современной медицине является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Преимуществами данного анализа является скорость и достоверность получаемых результатов. Однако, из-за низкой специфичности анализа, выявление НК-мишени может быть затруднено, например, в случае выявления однонуклеотидных полиморфизмов.

Хотя на эффективность ПЦР влияет множество факторов, структура праймеров определяет ее в значительной степени, что заставляет выбирать их нуклеотидную последовательность в ходе рационального дизайна. В качестве праймеров-затравок, помимо нативных олигодезоксирибонуклеотидов, эффективно используют олигонуклеотидные производные, в состав которых введены модифицированные фрагменты, повышающие специфичность выявления мутаций методом ПЦР. В последнее десятилетие особое предпочтение получили олигонуклеотиды, модифицированные по межнуклеотидному фосфату.

В настоящей работе предложены новые производные олигонуклеотидов - ФАО, модифицированные по фосфатному остатку гетероциклическими N-бензоазольными группами [1]. Нами отработана синтетическая схема введения таких фрагментов в ходе автоматического твердофазного фосфитамидного метода синтеза, что позволяет с высоким выходом получать последовательности ДНК гетеронуклеотидного состава с заданным положением модификаций. Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала исследована термостабильность ДНК/ДНК и ДНК/РНК дуплексов производных олигонуклеотидов.

Впервые исследована возможность и эффективность ферментативного матричного удлинения модифицированных ФАО. На модельных системах изучено влияние положения и вида модификации в праймере и матрице на удлинение праймера Taq ДНК-полимеразой. Установлены положения в составе праймерной и матричной цепи, в которых введение модификаций снижает эффективность удлинения праймеров.

ФАО были испытаны в качестве праймеров для выявления однонуклеотидных замен методом аллель-специфической ПЦР на примере мутации в гене KRAS с использованием модельной мутантной плазмидной ДНК на фоне ДНК дикого типа. Определены закономерности влияния числа модификаций и их положения в составе праймера на эффективность и специфичность протекания ПЦР. Полученные результаты указывают на перспективность использования новых аналогов нуклеиновых кислот для решения научных и практических задач с использованием метода ПЦР.

Публикации

1. Vasilyeva, S. V., Baranovskaya, E.E., Dyudeeva, E.S., Lomzov, A.A., Pyshnyi, D.V. Synthesis of Oligonucleotides Carrying Inter-nucleotide N-(Benzoazole)-phosphoramidate Moieties // ACS omega. 2023. Vol. 8. N. 1. P. 1556-1566.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 23-14-00358

Влияние нуклеотидного контекста на термодинамические и флуоресцентные свойства ДНК-дуплексов, содержащих флуоресцентную модификацию, введенную по гетероциклическому основанию

А.А. Пушкаревская^{1,2}, А.В. Аралов³, А.А. Ломзов^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский государственный университет*

³ *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

За последние 60 лет было получено множество химически модифицированных мономеров нуклеиновых кислот, которые были включены в олигонуклеотидные последовательности химическим или ферментативным синтезом. Данные молекулы создаются в первую очередь для повышения функционала и стабильности природных биополимеров целью применения их в качестве терапевтических средств и элементов биосенсоров. Во всем мире ведется активная разработка новых флуоресцентных производных нуклеиновых кислот.

В данной работе исследованы гибридизационные и флуоресцентные свойства олигонуклеотидов в структуру которых введен флуорофор по N6-положению аналога аденина. Показано влияние нуклеотидного контекста на термодинамические и флуоресцентные свойства ДНК-дуплексов, содержащих флуоресцентную модификацию, введенную по гетероциклическому основанию. Установлен значительный потенциал использования данных олигонуклеотидов для молекулярной детекции однонуклеотидных замен (SNP).

В качестве модельных объектов были выбраны 10-звенные олигонуклеотиды, содержащие одну флуоресцентную модификацию в N-6 положении. Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала были определены термодинамические параметры формирования дуплексов, содержащих флуоресцентную модификацию. На начальном этапе рассматривали изменение термостабильности комплексов, в которых варьировали нуклеотиды, расположенные в комплементарной цепи напротив модификации. Дестабилизация комплексов наблюдалась в случае аденина распложенного напротив модификации. Далее изменяли ближайшее нуклеотидное окружение с 3'- и 5'- конца. Наибольшая дестабилизация модифицированных комплексов наблюдается, в случае если нуклеотиды, окружающие модификацию с 3'- и 5'- сторон, содержат пиримидиновое основание.

Методом флуоресцентной спектроскопии были исследованы спектры флуоресценции и определены квантовые выходы флуоресценции модифицированных нуклеозидов, олигонуклеотидов и их комплексов с ДНК в воде и в глицерине.

Таким образом, были исследовано влияние нуклеотидного контекста на термодинамические и флуоресцентные свойства модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов. Полученные результаты будут использованы для разработки систем молекулярной диагностики генетических заболеваний.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 123021600208-7

© А.А. Пушкаревская, А.В. Аралов, А.А. Ломзов, 2023

Использование методов молекулярной динамики для прогнозирования структуры и термодинамических параметров нативных и модифицированных по рибозофосфатному остову олигонуклеотидов

Юшин И. И.^{1,2}, Голышев В. М.^{1,2}, Ломзов А. А.^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет

Короткие фрагменты нуклеиновых кислот (НК) – олигонуклеотиды в настоящее время активно используют в качестве инструментов для решения различного спектра прикладных задач. Как правило, нативные олигонуклеотиды не обладают необходимыми физико-химическими и молекулярно-биологическими свойствами. Поэтому в последнее время большой интерес для исследователей представляют олигомеры НК имеющие в своем составе одну или набор модификаций. Так производные нуклеиновых кислот уже активно используют как в медицине в роли НК-направленных терапевтических средств, так и в качестве зондов в молекулярной диагностике.

Одним из основных свойств дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) и рибонуклеиновых кислот (РНК) является способность формировать устойчивые двуцепочечные антипараллельные правозакрученные спирали посредством формирования водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями и стэкинг-взаимодействия. Понимание процесса формирования вторичной структуры нативных и модифицированных олигонуклеотидов, а также прогнозирование их гибридизационных свойств необходимо для рационального дизайна и дальнейшего их использования. Так компьютерные методы расчетов позволяют проводить структурный анализ достаточно больших молекул и эффективно предсказывать их термодинамические параметры. Метод молекулярной динамики дает все более реалистичные результаты и все чаще применяется для *in silico* исследований свойств биополимеров.

В данной работе нами была исследована применимость метода взвешенных гистограмм (WHAM) для анализа молекулярно-динамических траекторий с целью получения термодинамических параметров гибридизации комплексов нативных и фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов, а также пептидных НК (PNA) разной длины и нуклеотидного состава. Траектории были получены моделированием в разных силовых полях, а также явной и неявной водных оболочках. Нами были получены значения свободной энергии Гиббса при различных температурах, которые мы использовали для расчета энтальпийного и энтропийного вкладов в свободную энергию образования комплекса. Используя величины ΔH° и ΔS° , рассчитывали температуру плавления комплексов ($T_{пл}$).

Метод взвешенных гистограмм показал высокую эффективность и достаточно высокую достоверность прогностического расчета термодинамических параметров при анализе молекулярно-динамических траекторий комплексов нативных и модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов. Мы получили хорошую корреляцию между термодинамическими параметрами, полученными с использованием метода WHAM и экспериментально. Полученные результаты открывают новые возможности для рационального дизайна конструкций на основе модифицированных олигонуклеотидов.

Создание флуоресцентно-меченых нитрозилированных форм человеческого сывороточного альбумина путем транснаитрозилирования с помощью S-нитрозоглутатиона.

Курочкин Т.Н., Аврамчук Т.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Окись азота – это природный свободный радикал, выполняющий в организме целый ряд функций. NO выделяется макрофагами крови и тканей и выполняет роль защитного средства против микроорганизмов. Так же NO является важной молекулой в отношении процессов канцерогенеза. В свете широкого распространения в настоящее время персистирующих, а также латентных бактериальных инфекций и проблем терапии раковых опухолей, чрезвычайно актуальной задачей является разработка молекулярных инструментов - доноров NO, которые не только обладают терапевтической активностью, но и позволяют детектировать скрытые очаги бактериальных инфекций или опухолевые очаги в организме.

Сывороточный альбумин, основной белок плазмы крови имеющий свободный остаток Cys 34, рассматривается как один из главных переносчиков оксида азота в организме. Он может образовываться *in vivo* путем транснаитрозилирования с помощью S-нитрозоглутатиона. Кроме этого, альбумин имеет особенность накапливаться в раковых клетках. Таким образом, создание нитрозилированных форм альбумина, модифицированных сигнальной молекулой является хорошей стратегией решения поставленной задачи. В современных исследованиях проблема создания нитрозилированного альбумина является через восстановление его цистиновых мостиков и последующее нитрозилирование освободившихся меркапто-групп. Однако это влечет за собою изменение пространственной укладки альбумина, что может отрицательно влиять на его биологические свойства.

В нашей работе мы предлагаем стратегию создания конструкции на основе человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), имеющего флуоресцентную метку, присоединенную к остатку Cys 34 и молекул NO, присоединенных по меркаптогруппам, высвобождающимся при ацилировании ЧСА тиолактом гомоцистеина. При этом нитрозилирование альбуминовых конструкций проводится путем переноса NO с S-нитрозоглутатиона. Так же в работе представлена методика создания S-нитрозоглутатиона. Успешное получение нитрозилированных форм альбумина и глутатиона подтверждено различными физико-химическими методами.

Работа выполнена в рамках Государственного задания 121031300042-1.

Гибридные молекулярно-импринтированные полимеры для биомедицинских применений

Седельникова А. Ю.^{1,2}, Дмитриенко Е. В.^{1,2}

¹ *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

² *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Актуальной задачей современных исследований является разработка эффективных систем для биомедицинских применений, включающих диагностику, терапию и доставку лекарственных препаратов, для которых основополагающими критериями являются управляемость и специфичность. Использование комбинированного подхода при создании гибридных материалов позволяет объединить преимущества отдельных компонентов в одной системе и обеспечить выполнение всех необходимых требований.

Основываясь на перспективности использования композитных наноматериалов, в данной работе представлен простой и удобный подход к получению гибридного магнитного молекулярно-импринтированного полимера (ММИП) на основе нейлона-6 и наночастиц магнетита. В ходе исследований подобран оптимальный состав реакционной смеси для получения эффективных ММИП с достаточными магнитными свойствами для управления системой под действием внешнего магнитного поля. Для полученных гибридных полимерных материалов определены морфологические и размерные характеристики, а также подтвержден их химический состав. При сравнении ММИП с неимпринтированными аналогами продемонстрирована хорошая адсорбционная способность отпечатанных материалов, а также оценены сродство и специфичность связывания с модельным молекулярным шаблоном, в роли которого выступал метиленовый синий. В сравнительных экспериментах по связыванию со структурными аналогами целевой молекулы доказана селективность полученных ММИП. Подобраны условия удаления молекулярного шаблона из полимерной матрицы, а также исследована возможность повторного использования полученных гибридных материалов. При взаимодействии ММИП с реальными образцами водных растворов в присутствии различных примесей продемонстрированы прекрасная стабильность и помехоустойчивость нанокомпозитов.

Предложенная в данном исследовании гибридная полимерная платформа может являться перспективным инструментом для биомедицинских применений благодаря подходящим физико-химическим свойствам.

Sedelnikova A. et al. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for methylene blue capture // Magnetochemistry. 2023. – Vol. 9. – №. 8. – P. 196.

Исследование было поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН №121031300042-1.

Синтез и исследование антибактериальной активности производных DABCO с карвакролом

Задворных Д. А., Бардашева А. В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Проблема возникновения и распространения антибиотикоустойчивых штаммов бактерий в настоящее время становится все более актуальной. Одним из возможных способов решения данной проблемы является создание новых мультитаргетных антибактериальных препаратов.

Ранее в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН были разработаны и изучены поликатионные амфифильные соединения на основе 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана (DABCO), продемонстрировавшие высокую антибактериальную активность путем воздействия на две мишени: РНК и клеточные стенки. Карвакрол (5-изопропил-2-метилфенол) является основным компонентом эфирных масел душицы и тимьяна. Было показано, что он обладает антибактериальным действием широкого спектра, а также способен проявлять противовоспалительные, противораковые и антиокислительные свойства. В рамках данной работы было предложено синтезировать серию поликатионных амфифильных соединений, являющихся производными DABCO с карвакролом, способных одновременно воздействовать на несколько разных мишеней в клетке бактерий, и исследовать их биологическую активность.

Были разработаны методы синтеза и получены целевые соединения, содержащие остатки DABCO и карвакрола. Соединения отличаются длиной и типом линкерной группы между остатками DABCO и длиной линкерной группы между остатками DABCO и остатками карвакрола. Структуры полученных соединений подтверждены методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Были определены значения минимальной подавляющей концентрации (МПК) полученных соединений в отношении нескольких грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий, была исследована РНК-гидролизующая активность, а также изучена кинетика действия полученных соединений на рост штамма *S. aureus*. По результатам исследования биологической активности был проведен анализ ее зависимости от структуры исследуемых соединений.

Исследование было поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН 121031300042-1

Белковые наночастицы: новый подход к синтезу и исследование свойств

Григорьева Е.В.,¹ Гаврилова К.С.,^{1,2} Богомолова А.И.,² Полетаева Ю.Е.,¹ Рябчикова Е.И.,¹
Дмитриенко Е.В.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский Государственный университет, Новосибирск, Россия*

В последние десятилетия наноматериалы нашли широкое применения в биомедицине. Одним из таких направлений является таргетная терапия, основным компонентом которой выступают наночастицы. Наночастицы на основе сывороточного альбумина человека являются перспективным методом доставки лекарственных препаратов направленных на борьбу со злокачественными новообразованиями. Наноконструкции данного типа обладают высокой биосовместимостью и биоразлагаемостью, имеют контролируемые профили высвобождения, а также являются основой для усиления доставки токсичных и/или гидрофобных лекарственных препаратов.

В данной работе рассмотрен уже ранее известный способ получения наночастиц на основе альбумина с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего агента. Исследованы условия формирования частиц, такие как температура, растворитель, количество реагентов, влияющие на физические свойства наночастиц. Для данного типа наночастиц исследовались размерные и емкостные характеристики, а также кинетические параметры высвобождения в широком диапазоне рН и в присутствии протеолитического фермента – протеиназы К. Работы проведены как с адсорбированными, так и с внедренными внутрь наночастиц красителями и модельным препаратом – доксорубицином. Методом динамического светорассеяния исследовали гидродинамический диаметр всех наночастиц, который не превышает 200 нм как с адсорбированными, так и с внедренными внутрь молекулами, индекс полидисперсности для всех образцов составил от 0,04 до 0,2. Для всех типов наночастиц установлено, что емкость наноконструкций как при адсорбции, так и включении модельных молекул зависит от их заряда и степени гидрофобности.

Также разработан новый метод синтеза наночастиц на основе сывороточного альбумина человека с использованием ультрафиолетового излучения в качестве сшивающего агента. Рассмотрено варьирование условий синтеза: органический растворитель (ацетон, ацетонитрил, этиловый спирт), рН раствора, доза облучения УФ, - для формирования стабильных белковых наночастиц. Методом динамического светорассеивания и просвечивающей электронной микроскопии установлены размерные и морфологические характеристики наночастиц. Наночастицы имеют правильную сферическую форму, их гидродинамический диаметр варьируется от 50 до 130 нм. Исследована стабильность полученных образцов как в водных, так и в спиртовых растворах и способность проникновения в клетку.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 12103130042-1.

Новые борсодержащие соединения для тераностики злокачественных опухолей

Рогалева В. И.¹, Ван М.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) – перспективная методика лечения рака, направленная на селективное уничтожение раковых клеток без вреда для окружающих опухоль здоровых тканей. Несмотря на то, что БНЗТ ориентирована на лечение опухолей, практически не поддающихся другому терапевтическому воздействию (глиобластом, астроцитом и др.), применение этого метода в клинической практике до сих пор не распространено. Это связано с отсутствием борсодержащих соединений, способных селективно доставлять бор в опухоли. Учитывая, что в условиях БНЗТ большая часть ионизирующей энергии, передаваемой тканям, локализуется в клетках, нагруженных бором-10, именно биораспределение соединений бора является ключом к эффективности терапии. Препараты БНЗТ, применяемые сегодня в клинике (борфенилаланин и боркапнат натрия), не удовлетворяют критерию накопления бора в опухоли, а механизмы накопления остаются до конца не ясны.

Новейшие разработки в области соединений для БНЗТ касаются систем адресной доставки, в которых борсодержащие молекулы конъюгируются с опухоль-специфичными биологическими объектами (липосомами, белками, пептидами и др.). Кроме того, в последние годы для минимизации вредных побочных воздействий на пациента возник новый класс препаратов – тераностиков, обеспечивающих как таргетную доставку терапевтического препарата в опухоль, так и ее визуализацию.

В целях БНЗТ на основе человеческого сывороточного альбумина были разработаны новые борсодержащие тераностики, которые позволяют отслеживать накопление бора в опухоли в режиме реального времени, а также оказывают комбинированное терапевтическое воздействие на опухолевые ткани за счет содержания в структуре цитостатика [1,2]. Наша стратегия модификации альбумина не приводит к уменьшению времени циркуляции белка в крови, а дизайн конечных борсодержащих конъюгатов предусматривает программированное высвобождение терапевтической субстанции в опухоли. Новые конъюгаты исследованы на предмет цитотоксичности в отношении клеток глиобластомы человека (T98G) в условиях БНЗТ, а также без облучения.

1. Raskolupova V.I., Popova T.V., Zakharova O., Nikotina A.E., Abramova T.V., Silnikov V.N. Human Serum Albumin Labelling with a New BODIPY Dye Having a Large Stokes Shift. *Molecules*. 2021, 26, 2679.
2. Raskolupova V.I., Wang M., Dymova M.A., Petrov G.O., Shchudlo I., Taskaev S.Y., Abramova T.V., Godovikova T.S., Silnikov V.N., Popova T.V. Design of the New Closo-Dodecarborate-Containing Gemcitabine Analogue for the Albumin-Based Theranostics Composition. *Molecules*. 2023, V. 28, P. 2672.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1