

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ СО РАН



V ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ»,
ПРИУРОЧЕННАЯ К 40-ЛЕТИЮ ИХБФМ СО РАН

Новосибирск, 9–12 июля 2024 г.
МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

НОВОСИБИРСК
2024

УДК 577
ББК 28.072

Физико-химическая биология. Материалы V всероссийской конференции, приуроченной к 40-летию ИХБФМ СО РАН. – Новосибирск, 9–12 июля 2024 г. Новосибирск. ООО «Офсет-ТМ». 2024. 112 стр.

Сборник содержит материалы конференции «Физико-химическая биология».

Сборник предназначен для широкого круга биохимиков, биофизиков, специалистов в молекулярной и клеточной биологии.

Программный комитет:

**Председатель
академик РАН
Лаврик Ольга Ивановна**

Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск

**Член-корреспондент РАН
Зенкова Марина Аркадьевна**

Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск

**Член-корреспондент РАН
Жарков Дмитрий Олегович**

Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск

**Воробьева Мария
Александровна**

Институт химической биологии и фундамен-
тальной медицины СО РАН, Новосибирск

**Кузнецов Никита
Александрович**

Институт химической биологии и фундамен-
тальной медицины СО РАН, Новосибирск

Организационный комитет:

Пестряков П.Е., Лебедева Н.А., Зуева А.И., Васильева А.М., Жиловская И.Н.

СПОНСОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ

ГЕНЕРАЛЬНЫЕ СПОНСОРЫ



**Группа компаний «Биосан» и
«Биолабмикс»**

630090, Новосибирск, ул. Инженерная, 28
107045, Москва,
б-р Рождественский, 9, стр 1, офис 11
sales@biolabmix.ru
www.biosan-nsk.ru
www.biolabmix.ru



ООО «Диаэм»

129346, Россия, Москва, а/я 100.
8 (800) 234-05-08
info@dia-m.ru
www.dia-m.ru

СПОНСОРЫ



ООО «БИОССЕТ»

630090, г. Новосибирск,
ул. Инженерная, д. 28.
Тел. +7 (383) 363-93-81.
info@biosset.com
www.biosset.com



ООО «БиоЛайн»

197022, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Профессора Попова, д. 23, лит. Е
+7 (812) 320 49 49
main@bioline.ru
<https://bioline.ru>



ООО «Аламед»

РФ, 125167, г. Москва,
ул. Красноармейская, д. 2, стр. 4, офис 204
+7 (495) 614-45-97
info@alamed.ru
alamed.ru



ООО «Лакопа»

Тел: +79457408830
info@lacopa.group
<https://lacopa.group/>



ООО «ТД «ХИММЕД»

115230, Москва, Каширское шоссе, д. 3,
корп. 2, стр. 4/9,
+7 (495) 640 4192, (499) 682 6555
mail@chimmed.ru
630090, Новосибирск, просп. Академика
Лаврентьева, 6/1,
+7 (383) 335 6108
sibir@chimmed.ru
www.chimmed.ru



Компания МИЛЛАБ

Представительство в г.Новосибирске
Тел: +7 (383) 363-09-00, 8-960-780-24-86
sibir@millab.ru
www.millab.ru

Генные технологии здоровья

ДИА•М

www.dia-m.ru

СЕРИЯ G Генетический анализатор

Генетический анализатор серии G — это полностью автоматическая многоканальная платформа для генетических операций с функциями анализа фрагментов и секвенирования.

Анализатор поставляется со следующими компонентами системы: Система впрыска клея; Система оптического пути; Автоматическая система пробоотборника; Система контроля температуры; Компьютерно-программный комплекс; Модуль силовой цепи; Модуль стеллажной конструкции.



Преимущества для производительности

Широкий диапазон флуоресцентного определения

Твердотельный лазерный источник возбуждения, длина волны возбуждения 505 нм, диапазон дальности обнаружения до 650 нм, флуоресцентный канал обнаружения поддерживает до шести цветов.

01

Однородность сигнала качества

Режим спектральной проводимости оптического волокна, двухлучевое лазерное устройство и высокоустойчивая система оптического пути обеспечивают высокую степень однородности энергетического сигнала.

02

Высокая совместимость расходных материалов

Поддержка замены различных типов расходных материалов, таких как формамиды, полимеры и прочие ключевые расходные материалы.

03

Параметры	G08	G16	G24
Количество капилляров	8	16	24
Скорость обработки (36 см / режим Р4)	16 образцов/час	32 образцов/час	48 образцов/час
Размеры (Г x Ш x В)	610 × 710 × 820 мм		
Масса	105 кг		
Характеристики лазера	Твердотельный лазер нового типа и высокой мощности 505 нм		
Длина волны лазера, нм	505		
Диапазон флуоресцентного определения, нм	522—650		
Мощность лазера, мВт	50		
Диапазон напряжения, кВ	0—20		
Условия эксплуатации	Влажность: 20–80 % (без конденсации); Температура в помещении: 20–30 °С, колебания температуры <± 2 °С.		
Денатурация перед электрофорезом	Нет		
Уровень открытости системы	Открытая		
Время определения, мин	30		
Длина капилляров	36 см (50 см для функции секвенирования)		
Формат	.fsa/.abi		
Гарантия, лет	1		
Метод отбора проб	Автоматический отбор проб, 96-луночный планшет * 2		
Метод ввода полимера	Автоматический ввод		
Интеллектуальная подготовка образцов	Набор красителей, режим работы, приоритет и спектральная калибровка могут быть автоматически изменены группой выполнения; Поддержка приоритета автозаполнения и настройки; Поддержка переименования и запуска уже запускавшейся таблицы образцов.		
Контроль прибора	Статус планшета для образцов А/В; Контроль в реальном времени		

Диаэм, Москва ■ ул. Магаданская, д. 7, к. 3 ■ тел./факс: 8 (800) 234-0508 ■ sales@dia-m.ru



С.-Петербург
spb@dia-m.ru

Новосибирск
nsk@dia-m.ru

Воронеж
vm@dia-m.ru

Йошкар-Ола
nba@dia-m.ru

Красноярск
krsk@dia-m.ru

Казань
kazan@dia-m.ru

Ростов-на-Дону
rnd@dia-m.ru

Екатеринбург
ekb@dia-m.ru

Кемерово
kemerovo@dia-m.ru

Нижний Новгород
nnovgorod@dia-m.ru

мобильное приложение



www.dia-m.ru

[Высокоточная амплификация]

High-fidelity amplification



Высокоточные ДНК-полимеразы Biolabmix®

Высокоточные ДНК-полимеразы обеспечивают исключительную точность, скорость и производительность для всех приложений ПЦР

Данные ферменты значительно превосходят *Pfu* и *Taq* полимеразы по следующим параметрам:



ПРОЦЕССИВНОСТЬ



ТОЧНОСТЬ СИНТЕЗА



СКОРОСТЬ АМПЛИФИКАЦИИ
ФРАГМЕНТОВ



УСТОЙЧИВОСТЬ К
ИНГИБИТОРАМ ПЦР

Фьюжн ДНК-полимераза

Кат № E-11001 100 е. а.
Кат № E-11005 500 е. а.

Набор для проведения ПЦР с Фьюжн ДНК-полимеразой

Кат № КН041-100 50 мкл
Кат № КН041-500 250 мкл

Фьюжн 2.0 полимераза

Фермент с двумя различными буферами:

- для высокоточной амплификации
- для амплификации из образцов с высоким содержанием ингибирующих веществ

Кат № E-14001 100 е. а.
Кат № E-14005 500 е. а.

Каждая партия фермента тестируется на активность фермента, электро-форетическую чистоту в SDS-ПААГ, отсутствие неспецифической нуклеаз-ной активности.

High-fidelity
amplification

Biolabmix® Fusion
DNA polymerase

Sso7d
protein



Заказать высокоточную
ДНК-полимеразу на сайте
biolabmix.ru

Умная линейка для выделения ДНК

Набор для выделения ДНК
из образцов крови.

D-BLOOD

Набор для выделения ДНК
из тканей животных
и человека

D-TISSUES

Набор для выделения ДНК
из мазков и соскобов
эпителиальных клеток,
слюны

D-SWABS

Эффективный протокол
выделения ДНК из клеток
с отличным спектром.

D-CELLS

Набор для выделения ДНК
из растительных образцов
на колонках

D-PLANTS

- ❑ Высокий выход чистой ДНК
- ❑ Широкий спектр образцов
- ❑ Выделение на колонках
- ❑ Разнообразие методов использования выделенной ДНК
- ❑ Протеиназа К в наборе для эффективного лизиса



BIOSAN **Biolabmix®**
ГРУППА КОМПАНИЙ



Заказать наборы
для выделения ДНК на сайте
biolabmix.ru

ООО «БИОССЕТ»



Разработка и производство автоматического оборудования для синтеза ДНК- и РНК-олигонуклеотидов

- 29 лет успешной работы
- Изготовлено 362 единицы автоматического оборудования
- Поставлено на экспорт в 27 стран

Синтезаторы
ДНК/РНК



Расходные
материалы



Установки
для очистки
олигонуклеотидов



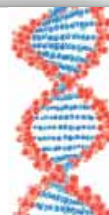
Реактивы
для синтеза
олигонуклеотидов



Оборудования
для подготовки
реактивов
и обработки
после синтеза



Синтез
олигонуклеотидов
под заказ



www.biosset.com

630090, г. Новосибирск, ул. Инженерная, 28
Тел.: +7 (383) 363-93-81 E-mail: info@biosset.com

**ФУНКЦИИ БЕЛКОВ В ПРОЦЕССАХ ПЕРЕНОСА
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ
И ОБЕСПЕЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА**

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Новые оксидазы биогенных аминов и их потенциальные применения

Атрошенко Д.Л.^{1,2,3}, Сергеев Е.П.^{1,2}, Головина Д.И.^{1,2}

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет, Москва, Россия

³ Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы,
Медицинский институт, Москва, Россия

Биогенные амины — это органические соединения, образующиеся в живых организмах и участвующие в различных биологических процессах. Они включают соединения с первичной аминогруппой (такие как серотонин, гистамин, путресцин и т.д.) и со вторичной аминогруппой (такие как спермин, спермидин и т.д.). Биогенные амины выполняют множество биологических функций и могут являться нейромедиаторами, гормонами и модуляторами физиологических процессов.

Детекция биогенных аминов имеет большое значение в различных областях биотехнологии. В медицине, уровень этих соединений может быть использован в качестве диагностического инструмента для выявления различных заболеваний, включая опухоли и неврологические расстройства. В пищевой промышленности, контроль уровня биогенных аминов в продуктах питания важен для обеспечения их безопасности и качества.

Для детекции биогенных аминов в основном используют хроматографические методы. Технически простой и недорогой альтернативой является детекция с использованием ферментов. Основным ограничением данного подхода является необходимость проведения сложных поисковых исследований с целью поиска подходящего фермента под каждую конкретную методику.

FAD-зависимая полиаминоксидаза (РАО, ЕС 1.5.3.17) катализирует окисление биогенных аминов по вторичным аминогруппам. Наиболее важными субстратами большинства РАО являются спермин, спермидин и их ацильные производных. Медь-зависимая аминоксидаза (CuАО, ЕС 1.4.3.21 и ЕС 1.4.3.22) катализирует окисление биогенных аминов по первичной аминогруппе. Наиболее важными субстратами CuАО являются гистамин, путресцин и кадаверин.

В данной работе были клонированы и охарактеризованы новые FAD-зависимая полиаминоксидаза и медь-зависимая аминоксидаза. Ферменты были экспрессированы в клетках *E.coli* и получены в высокоочищенном виде. Для данных ферментов изучены зависимости активности и стабильности от температуры и от pH, определены каталитические параметры с основными субстратами. Исследованные ферменты обладают хорошими кинетическими характеристиками, что делает их перспективными для применения в биотехнологии для детекции биогенных аминов.

Роль рибосомных белков в механизме трансляции и поддержании репертуара транслятома

Малыгин А. А., Бабайлова Е. С., Булыгин К. Н., Золотёнова Е. А., Гопаненко А. В.,
Тупикин А. Е., Кабилов М. Р., Очкасова А. С., Грайфер Д. М.

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

Рибосомные белки являются структурными компонентами рибосомы и критически важны для её активности. Мы определили аминокислотные остатки рибосомных белков eL42 и uL15 человека, расположенных в районе каталитического центра рибосомы, которые определяют её работу. Замена остатков Q45, Q51 или K53 в белке eL42 приводит к остановке трансляции на первом цикле элонгации пептидной цепи, поскольку указанные остатки участвуют в удалении деацилированной тРНК из Е-сайта рибосомы, без чего невозможна транслокация тРНК на рибосоме [1]. В белке uL15 остаток His39 в норме гидроксирован. Мы показали, что такая посттрансляционная модификация необходима для нормальной работы рибосомы, и при невозможности такой модификации эффективность трансляции падает в результате нарушения согласованного движения рибосом по мРНК. В результате преимущество в трансляции получают более короткие и распространенные мРНК перед более длинными и редкими, что разбалансирует клеточный протеом. Белок uS3 вне рибосомы способен расщеплять ДНК по AP-сайтам. Мы обнаружили, что ферментативные свойства uS3 непосредственно обеспечивают его аминокислотные остатки R173/R178.

Гены рибосомных белков являются одними из наиболее активных генов клетки, и наследственная гаплонедостаточность отдельных рибосомных белков, вызванная мутациями в одном из аллелей их генов, является причиной анемии Даймонда-Блэкфена и других рибосомопатий. Мы выполнили нокдаун рибосомных белков uL5, uS10 и eS26 в клетках НЕК293Т, что привело к дефициту рибосом. С помощью RNA-seq анализа общей клеточной мРНК и мРНК в полисомной фракции мы выявили существенные различия в ландшафте транскриптома и транслятома в таких клетках по сравнению с клетками с нормальным уровнем рибосом. Анализируя физические параметры мРНК дифференциально экспрессируемых генов, мы установили, что изменение эффективности трансляции мРНК в клетках с дефицитом рибосом зависит от общего уровня мРНК, длины её кодирующей последовательности и GC-состава. Более распространённые мРНК в таких клетках с протяжёнными CDS и высоким GC-составом транслируются в таких условиях более эффективно, чем мРНК с противоположными характеристиками [2].

1. Bulygin K.N., Malygin A.A., Graifer D.M. Functional involvement of a conserved motif in the middle region of the human ribosomal protein eL42 in translation. // *Biochimie* – 2023 – V. 218. – P 96-104.
2. Tian Y, Babaylova E.S., Gopanenko A.V., Tupikin A.E., др. всего 6 человек. Deficiency of the ribosomal protein uS10 (RPS20) reorganizes human cells translatoome according to the abundance, CDS length and GC content of mRNAs. // *Open Biol.* – 2024 – V. 14. – 230366.

Изучение механизма влияния белка Sam68 на каталитическую активность фермента PARP1

Бережнев Е. А.^{1,2}, Науменко К.Н.², Лаврик О.И.²

¹ Новосибирский государственный университет

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Сохранение целостности генетической информации во многом обеспечивается механизмами репарации ДНК. Репарация ДНК — это сложный многостадийный процесс, нуждающийся в тонкой регуляции. На данный момент важнейшим регулятором процесса репарации ДНК считается поли(ADP-рибоза)полимераза 1 (PARP1). PARP1 способна детектировать повреждения ДНК и в ответ начинать синтез поли(ADP-рибозы). Поли(ADP-рибоза), ковалентно присоединенная к белкам-акцепторам, способствует их диссоциации из комплекса с ДНК в месте повреждения. Поли(ADP-рибоза) выступает в качестве сигнальной молекулы, привлекая белки-участники репарации к месту повреждения ДНК. С использованием методов масс-спектрометрического анализа, было обнаружено, что многие РНК-связывающие белки могут быть поли(ADP-рибозил)ированы и взаимодействовать с PARP1. Одним из кандидатов, среди РНК-связывающих белков, взаимодействующих с PARP1 в условиях генотоксического стресса, выступает Sam68. Было показано, что Sam68 участвует в регуляции процесса репарации ДНК, выступая в качестве ключевого регулятора ферментативной активности PARP1. Однако детальный механизм влияния Sam68 на регуляцию поли(ADP-рибозил)ирования установлен не был. В ходе выполнения текущего исследования, был получен экспрессионный вектор, содержащий кодирующую последовательность Sam68, оптимизирована методика выделения белка Sam68. Было показано, что Sam68 выступает акцептором реакции поли(ADP-рибозил)ирования и увеличивает общий выход синтезируемой поли(ADP-рибозы). Была проведена количественная оценка комплексообразования Sam68 с поврежденной ДНК и с очищенной поли(ADP-рибозой). Методом анизотропии флуоресценции установлено, что Sam68 не способен образовывать комплекс с PARP1 на поврежденной ДНК. Sam68 связывается с синтезируемой поли(ADP-рибозой) и может являться мишенью поли(ADP-рибозил)ирования. Находясь в комплексе с синтезируемой поли(ADP-рибозой) Sam68 экранирует отрицательный заряд этого полимера стабилизирует каталитически активный комплекс PARP1 с ДНК в ходе элонгации.

Грант РФФ № 22-74-10059

Механизм синтеза ДНК *ab initio*

Гарафутдинов Р. Р.¹, Сахабутдинова А. Р.¹, Михайленко К. И.², Чемерис А. В.¹

¹ Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

² Институт механики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

Амплификация нуклеиновых кислот является основой большинства современных методов и технологий анализа, а также способов наработки специфических фрагментов ДНК и РНК. Ключевым компонентом любой амплификационной системы являются НК-полимеразы, однако они не обеспечивают абсолютную точность синтеза полинуклеотидных цепей. Была показана способность многих термостабильных ДНК-полимераз, в том числе широко используемых коммерческих полимераз Taq и Tth, осуществлять синтез ДНК *ab initio* [1, 2]. ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью склонны вести мультимеризацию нуклеиновых кислот [3]. Синтез ДНК *ab initio* протекает в отсутствие специфической мишени при наличии в амплификационной системе только олигонуклеотидных праймеров, а для некоторых полимераз - при наличии только дезоксинуклеозидтрифосфатов. В одной из работ было показано, что такой синтез приводит к продуктам со случайной, преимущественно, АТ-богатой нуклеотидной последовательностью [1], а в другой - к продуктам с последовательностью, содержащей кластеры GCC, CCG, AAA, TTT и ряд других [2]. Сообщалось о “разветвленном” характере продуктов *ab initio* синтеза, полученных в результате изотермической амплификации в присутствии никазы [4]. Протекание *ab initio* синтеза обуславливает неспецифическую амплификацию нуклеиновых кислот, что приводит к недостаточной достоверности получаемых результатов. О механизме синтеза ДНК *ab initio* ранее не сообщалось. Нами на модельных олигонуклеотидах с гомонуклеотидными последовательностями и последовательностями, состоящими из динуклеотидных повторов, изучено влияние структуры ДНК на эффективность синтеза *ab initio* под действием разных ДНК-полимераз в различных условиях. Определена первичная структура продуктов *ab initio* синтеза, предложен механизм протекания данного процесса.

1. Ogata N., Miura T. Genetic information ‘created’ by archaeobacterial DNA polymerase // *Biochem J.* - 1997. - V. 324. - P. 667-671.
2. Cheng D.W., Calderón-Urrea A. Nontemplate polymerization of free nucleotides into genetic elements by thermophilic DNA polymerase in vitro // *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids.* - 2011. - V. 11. - P. 979-990.
3. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R. The influence of reaction conditions on DNA multimerization during isothermal amplification with Bst DNA polymerase // *Appl. Biochem. Biotechnol.* - 2020. - V. 190. - P. 758-771.
4. Antipova V.N., Reveguk Z.V., Kraynyukov E.S., Zyrina N.V. Structure of DNA obtained during the *ab initio* synthesis by Bst DNA polymerase in the presence of the nicking endonuclease from *Bacillus stearothermophilus* (Nt.BstNBI) // *J. Biomol. Struct. Dyn.* - 2019. - V. 37. - P. 3314-3321.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 22-24-00235.

Транскриптомный анализ клеток HEK293A с нокаутом по гену белка TDP1

Дырхеева Н.¹, Захаренко А.¹, Малахова А.², Медведев С.², Закиян С.², Огорокова Л.³,
Штокало Д.³, Тупикин А.¹, Кабилов М.¹, Лаврик О.¹

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

² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

³ AcademGene LLC, Новосибирск, Россия

Был впервые проведен транскриптомный анализ клеток HEK293A с нокаутом по гену белка тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) (клетки TDP1^{-/-}). TDP1 – фермент репарации ДНК, который удаляет с 3'-концов ДНК ковалентные аддукты различного происхождения и является ключевым ферментом репарации ковалентных комплексов топоизомеразы 1 (TOP1)-ДНК. Предполагается, что TDP1 может быть одним из факторов резистентности опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам – ингибиторам TOP1, например, топотекану, поскольку TDP1 нивелирует действие топотекана, расщепляя комплекс TOP1-ДНК-топотекан [1]. TDP1 рассматривается как потенциальная терапевтическая мишень при лечении онкологических заболеваний.

С помощью метода CRISPR/Cas9 нами были получены клетки HEK293A с гомозиготным нокаутом по гену TDP1, которые были использованы нами в качестве клеточной модели для изучения механизмов действия противораковой терапии с помощью ингибиторов TDP1 [2]. Далее с помощью транскриптомного анализа было исследовано влияние нокаута гена TDP1 на изменения в уровне экспрессии генов в клеточной линии HEK293A человека [3]. Было исследовано три клеточных клона с нокаутом по гену белка TDP1. При сравнении клеток дикого типа с клетками TDP1^{-/-} были обнаружены дифференциально экспрессированные гены (ДЭГ), общие для трех клонов, с изменениями как в сторону повышения (86 генов), так и снижения (15 генов) уровня экспрессии. Интересно, что среди ДЭГ ферментов или факторов репарации ДНК обнаружено не было. Однако были получены данные, указывающие на роль TDP1 и в других процессах, помимо репарации комплекса ДНК-TOP1. Анализ ДЭГ показал, что нокаут по гену белка TDP1 может влиять на уровень экспрессии генов, участвующих в клеточной адгезии и коммуникации, сперматогенезе, функции митохондрий, нейродегенерации, цитокиновом ответе и сигнальном пути MAPK.

1. Comeaux E.Q., Waardenburg R.C. *Drug Metab. Rev.* – 2014 – 46 – С. 494-507.
2. Dyrkheeva N.S., et al. *Biomolecules.* – 2021 – 11 – 973.
3. Dyrkheeva N.S., et al. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* – 2024 – 1868(7):130616.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300041-4.

Взаимодействие неприродных нуклеиновых кислот, применяемых в синтетической биологии, с системой эксцизионной репарации оснований ДНК

Ендуткин А. В.¹, Юдкина А. В.¹, Ким Д. В.¹, Яковлев А. О.¹, Барматов А. Е.¹, Жарков Д. О.²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Спектр биоортогональных реакций и способов их реализации в живой клетке растет с каждым годом. Достижения в области синтетической химии нуклеиновых кислот делают эти биополимеры одними из самых удобных для осуществления биоортогональных реакций *in situ*. Модификация нуклеиновых кислот в живых клетках находится под плотным контролем со стороны систем репарации ДНК. Таким образом, репарация ДНК по определению препятствует реализации биоортогональных свойств модифицированной ДНК. Однако, проблема активности систем репарации и ответа на повреждения ДНК по отношению к модификациям, применяемым в синтетической биологии, не была объектом систематических исследований.

Было исследовано взаимодействие ферментов системы эксцизионной репарации оснований ДНК с несколькими классами неприродных нуклеотидных звеньев, используемых в синтетической биологии: нуклеотиды, использующиеся для клик-реакций, нуклеотиды с альтернативной хиральностью (β -L-нуклеотиды) и фотоактивируемые нуклеотиды. Кроме того изучено, как эти ферменты взаимодействуют с ДНК, содержащей неприродную межнуклеотидную связь, полученную клик-лигированием.

Гликозилазы не были способны удалять модификации из одноцепочечных субстратов. Белки MBD4 и SMUG1 были способны удалять алкилированные производные U из двухцепочечного субстрата. Наиболее ингибирующими активность гликозилаз оказались нуклеотиды с альтернативной хиральностью. Показано, что триазольная межнуклеотидная связь, может ингибировать активность гликозилаз и АП-эндонуклеаз. С другой стороны, все АП-эндонуклеазы проявляли к алкилированному производному АП-сайта даже большую специфичность, чем к аналогу природного АП-сайта. Эффективность включения нуклеотидов напротив неприродных модификаций по меньшей мере на порядок была меньше эффективности включения А напротив Т. В случае если синтез ДНК не блокировался модификацией, полимеразы образовывали «каноническую» пару или использовали правило «А». В условиях *in vivo* обнаружено, что пиримидиновые L-энантиомеры нормальных нуклеотидов подвергаются репарации менее эффективно пуриновых. Для алкилированных производных U не наблюдалось признаков репарации в клетках, а алкилированное производное АП-сайта, напротив, эффективно элиминировалось из ДНК в ходе репарации.

Использование нуклеиновых кислот с неприродными нуклеотидами для управления живыми клетками будет активно развиваться в ближайшие десятилетия. Поэтому вопрос о степени биоортогональности таких молекул будет становиться все более актуальным. Было показано, что не все неприродные нуклеотиды из числа исследованных могут находиться в живых системах без вмешательства в естественные биохимические процессы, а значит, не могут в полной мере считаться биоортогональными.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда, проект 21–74–10104.

Механизмы узнавания и превращения субстратов ДНК-гликозилазами

Жарков Д. О.^{1,2}

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Большинство поврежденных азотистых оснований удаляются из ДНК по пути эксцизионной репарации оснований. В начале этого пути специфичные к определенным наборам повреждений ферменты класса ДНК-гликозилаз гидролизуют *N*-гликозидную связь модифицированных, а в особых случаях — и нормальных нуклеотидов. Реакция гидролиза *N*-гликозидной связи в 2'-дезоксирибонуклеотидах протекает достаточно легко и в процессе эволюции независимо возникла не менее чем в 10 не связанных друг с другом структурных суперсемействах белков. Помимо нее, некоторые ДНК-гликозилазы дополнительно катализируют β -элиминирование 3'-фосфатной группы (β -элиминирование) или 3'- и 5'-фосфатных групп (β,δ -элиминирование). При этом реакции могут протекать с образованием ковалентного интермедиата азометиновой либо ацетальной природы. Характерное время существования таких интермедиатов может измеряться десятками минут, и они зачастую выступают организующим центром сборки динамических белковых комплексов, в которых осуществляется репарация.

Некоторые ДНК-гликозилазы отличаются очень узкой субстратной специфичностью, в то время как другие способны удалять из ДНК широкий круг поврежденных оснований. Однако во многих случаях даже при наличии экспериментально установленной структуры фермент-субстратных комплексов остается неясной природа субстратной специфичности ДНК-гликозилаз. Интересно, что замены аминокислотных остатков, которые по структурным данным критически важны для активности фермента, может иметь совершенно разные последствия для способности ДНК-гликозилаз превращать субстраты с разными видами повреждений. При этом, по-видимому, ключевую роль в функционировании фермента играет путь образования «комплекса узнавания» с поврежденным основанием внутри двойной спирали: наиболее эффективное узнавание природных субстратов осуществляется в режиме одномерной диффузии по контуру ДНК.

Исследование поддержано грантом РНФ № 24-14-00285 и государственным заданием 121031300056-8.

Комплекс короткого аргоната и HNH-нуклеазы защищает бактерии от чужеродной ДНК, вызывая гибель клеток по механизму абортной инфекции

Каневская А. А.¹, Кульбачинский А. В.¹

¹ *Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия*

Белки-аргонаты способны распознавать и расщеплять нуклеиновую кислоту – мишень благодаря комплементарным «гидовым» олигонуклеотидам. Аргонаты эукариот играют ведущую роль в процессе РНК-интерференции, используя и в качестве гида, и в качестве мишени РНК. Аргонаты прокариот исследованы значительно хуже и при этом более разнообразны не только структурно, но и функционально. В отличие от аргонатов эукариот, аргонаты прокариот могут использовать в качестве гидов и мишеней как РНК, так и ДНК.

С точки зрения структуры прокариотические аргонаты можно разделить на две группы: длинные аргонаты и короткие аргонаты. Короткие аргонаты состоят всего из двух доменов – MID-домена и PIWI-домена, причем в PIWI-доме отсутствует каталитическая тетрада, вследствие чего он не имеет нуклеазной активности. Однако было обнаружено, что у большинства коротких аргонатов рядом закодирован белок-партнер, состоящий из домена, названного «APAZ», и дополнительного домена. Оказалось, что APAZ подобен N-концевой части длинных аргонатов, а дополнительный домен может обладать разными активностями. Белки-партнеры могут быть разных типов, например, SIR2-APAZ, TIR-APAZ, SMEK-APAZ, DREN-APAZ, HNH-APAZ. Функции и механизмы активации большинства белков-партнеров в настоящее время не изучены.

В данной работе исследуются короткие аргонаты из нескольких бактерий, которые ассоциированы с белками-партнерами HNH-APAZ. Мы показали, что короткий аргонат и белок-партнер HNH-APAZ формируют гетеродимерный комплекс, который был назван SPARNA, сокращенно от short prokar^yotic Argonaute and HNH-APAZ. Белок-партнер HNH-APAZ является нуклеазой, которая способна расщеплять РНК и ДНК и имеет предпочтение к двухнитевой ДНК. Неспецифическая коллатеральная активность комплекса SPARNA появляется при связывании коротким аргонатом РНК-гида и комплементарной ему ДНК-мишени. При попадании в клетку чужеродной плазмиды происходит активация комплекса SPARNA и лизис клеток, что может защищать бактериальную популяцию по механизму абортной инфекции. Предположительно, активация SPARNA происходит из-за предпочтительного связывания аргонатом транскриптов из области ориджина репликации чужеродной плазмиды. Благодаря тому, что SPARNA расщепляет коллатеральный субстрат при распознавании комплементарной РНК-гиду ДНК-мишени, ее можно использовать в тест-системе для детектирования специфической ДНК. Таким образом, полученные данные не только расширяют наши знания о системах защит прокариот, но и создают новые возможности для биотехнологии.

Исследование было поддержано грантом РФФИ 22-14-00182.

Молекулярно-кинетические механизмы биокатализа и контроля субстратной специфичности ферментов

Кузнецов Н.А.

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

В настоящее время понимание механизмов ферментативных реакций базируются на статических структурных данных, данных классической стационарной кинетики и анализа строения интермедиатов и продуктов превращения субстратов. При этом ключевым принципом в ферментативном катализе, согласно модели индуцированного соответствия, является предположение о том, что молекулы фермента и субстрата претерпевают конформационные изменения, необходимые для достижения каталитически компетентного состояния. Поэтому именно анализ конформационной динамики является связующим звеном всех подходов к изучению механизмов действия ферментов и позволяет установить последовательность молекулярных процессов, которая приводит к образованию каталитического комплекса и обеспечивает специфичность фермента.

В ходе многолетних исследований разработана и развита комплексная методология регистрации и анализа конформационной динамики ферментов и субстратов в процессе их взаимодействия в режиме реального времени, основанная на кинетическом, термодинамическом и мутационном анализе изменений конформации ферментов и их субстратов. Разработанный подход апробирован на большом числе белков и ферментов. Суммарно в работах использовано более 150 ферментов дикого типа и их мутантных форм из различных организмов, включая человека, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium tetani* и др. Среди них ферменты репарации ДНК, такие как ДНК-гликозилазы и AP-эндонуклеазы, репликативные и репарационные ДНК-полимеразы, и ряд ДНК-процессирующих ферментов, например ДНК-диоксигеназы, ДНК-никазы, факторы транскрипции, также в работе использовали РНКазы, пиридоксаль-зависимые ферменты, каталитические антитела и ряд вирусных протеаз, включая протеазу коронавируса.

В целом, разработанная в ИХБФМ СО РАН методология и проведенное систематическое исследование большого числа ферментов внесли значительный вклад в понимание механизмов специфического узнавания субстратов и/или специфических сайтов изученными ферментами. Совокупность полученных результатов позволяет сделать заключение о том, что кинетический анализ конформационных изменений является важным источником данных, необходимых для интеграции результатов и построения механизма действия самых разнообразных ферментов, а также применения этих результатов для рационального дизайна и создания ферментов с измененными свойствами.

Многофункциональные AP-эндонуклеазы

Кузнецова А. А.

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

Под действием эндогенных или экзогенных повреждающих факторов происходит накопление повреждений азотистых оснований в геномной и митохондриальной ДНК, которые могут эффективно удаляться системой эксцизионной репарации оснований (BER). Процесс BER в значительной степени консервативен и играет важную роль в сохранении целостности генома. Апуриновые/апириимидиновые эндонуклеазы являются важными ферментами, играющими значительную роль в репарации ДНК. AP-эндонуклеазы осуществляют гидролиз цепи ДНК с 5'-стороны от AP-сайта, сформированного монофункциональными ДНК-гликозилазами, или углеводного остатка, сформированного в результате реакции β -элиминирования, катализируемой бифункциональными ДНК-гликозилазами. Как правило, AP-эндонуклеазы делят на структурные семейства Xth и Nfo на основании гомологии аминокислотной последовательности с экзонуклеазой III (Xth) и эндонуклеазой IV (Nfo) из *E. coli*. APE1, APE2 млекопитающих, Rrp1 *Drosophila melanogaster*, EXO3 *C. elegans* и Apn2 *S. cerevisiae* идентифицированы как гомологи экзонуклеазы III. AP-эндонуклеазы APN1 *C. elegans* и Apn1 *S. cerevisiae* являются гомологами эндонуклеазы IV. Интересно отметить, что у видов, которые эволюционно выше *C. elegans*, о гомологах эндонуклеазы IV не сообщалось. Однако, относительно недавно установлено еще одно семейство ДНК-эндонуклеаз, подобных ферменту EndoQ из *P. furiosus*, которые не имеют гомологии с известными AP-эндонуклеазами, но близки по спектру субстратной специфичности и механизму действия с ферментами семейства Xth и Nfo. Действительно, несмотря на существенные структурные отличия, спектр повреждений ДНК, процессируемых членами различных семейств, сильно пересекается. На примере APE1, одной из наиболее охарактеризованных эукариотических AP-эндонуклеаз, установлено, что данные ферменты помимо гидролиза AP-сайта могут участвовать в инцизионной репарации нуклеотидов, гидролизуя цепь ДНК с 5'-стороны от некоторых поврежденных нуклеотидов, способны удалять поврежденные и неповрежденные нуклеотиды с 3'-конца цепи ДНК посредством экзонуклеазной активности, могут расщеплять AP-сайты в РНК, а также расщеплять неповрежденную РНК и обладают активностью РНКазы H.

Несмотря на обширные исследования AP-эндонуклеаз, молекулярная основа их широкой субстратной специфичности и механизм распознавания модифицированных оснований и/или нуклеотидов, а также неповрежденных оснований ДНК еще не ясны. Следует отметить, что в настоящее время наиболее полно исследовано протекание эндонуклеазной реакции, тогда как другие типы активности изучены в меньшей степени. В связи с этим в рамках данной работы для выяснения ключевых этапов механизма взаимодействия этих ферментов с ДНК и РНК была проанализирована эффективность расщепления модельных субстратов, обладающих канонической (дуплекс) и неканонической структурой (G-квадруплекс и различного рода выпетливания). Кроме того, проведено сравнение особенностей протекания 3'-5'-экзонуклеазной реакции под действием ряда AP-эндонуклеаз и установлены характерные отличия между ферментами, принадлежащими к разным структурным семействам. Установлено, что ключевым фактором в механизме контроля субстратной специфичности является способность нуклеотида-мишени нарушать конформационную стабильность субстрата. Образование неспецифических к целевому нуклеотиду контактов между молекулой субстрата и аминокислотными остатками фермента в субстрат-связывающем центре индуцируют дополнительное «возмущение», необходимое для изгиба, раскручивания и локального плавления цепей субстрата, что, в свою очередь, приводит к выворачиванию «целевого» нуклеотида в активный центр фермента, и сопровождается расширением его внутреннего объема для размещения объемных азотистых оснований.

Исследование было поддержано ГЗ № 121112900214-2.

Роль РНК-связывающего белка YB-1 в регуляции активности поли(ADP-рибоза)полимеразы 1

Науменко К.Н.¹, Суханова М.В.¹, Лаврик О.И.¹

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

Исследование фундаментальных механизмов репарации повреждений ДНК является актуальной задачей современной молекулярной биологии и биохимии и необходимо для понимания механизма ответа клеток на генотоксические факторы, которые приводят к нарушению генетической стабильности и канцерогенезу, а также механизмов резистентности опухолей к препаратам химиотерапии. Ключевым регулятором репарации повреждений ДНК является фермент поли(ADP-рибоза)полимераза 1 (PARP1). PARP1 является основным сенсором одноцепочечных разрывов ДНК, катализируя синтез поли(ADP-рибозы) (PAR), ковалентно-присоединенной к белку-акцептору, используя в качестве субстрата NAD⁺. В настоящее время многие РНК-связывающие белки рассматриваются как возможные участники поддержания стабильности генома, поскольку повышенное содержание определенных РНК-связывающих белков в онкотрансформированных клетках часто коррелирует с резистентностью опухолей к радио- и химиотерапии. Кроме того, многие из них являются мишенями поли(ADP-рибозил)ирования или способны взаимодействовать с PAR. Одним из таких РНК-связывающих белков является мультифункциональный Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1).

В настоящем исследовании, было установлено влияние этого белка на кинетику поли(ADP-рибозил)ирования PARP1. YB-1 увеличивает начальную скорость и суммарный выход реакции поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемой PARP1, в том числе её мутантными формами, синтезирующими полимер АДФ-рибозы с разной структурой. С использованием делеционных мутантов YB-1 было установлено, что последовательное укорочение С-концевого домена YB-1 приводит к снижению сродства YB-1 к поврежденной ДНК и поли(ADP-рибозе). Установлено, что YB-1, взаимодействуя с синтезируемым полимером АДФ-рибозы в процессе авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1, способен ингибировать реакцию элонгации цепи. На основании полученных данных автором работы предложен механизм влияния YB-1 на каталитическую активность PARP1, где ключевыми событиями является формирование гетеродимера PARP1•YB-1 на поврежденной ДНК и поли(ADP-рибозе) в котором YB-1 является основным акцептором синтезируемой поли(АДФ-рибозы) удаляет продукт реакции, что приводит к увеличению числа оборотов и стимуляции процесса поли(ADP-рибозил)ирования.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-14-00112

Механизмы узнавания 5-метилцитозина ферментами системы активного эпигенетического деметилирования

Петрова Д. В.¹, Новопашина Д. С.¹, Кузнецова А. А.¹, Кузнецов Н. А.¹,
Пермякова Н. В.², Грин И. Р.¹, Жарков Д. О.^{1,3}

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

² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Метилирование ДНК играет важную роль в регуляции экспрессии генов у эукариот. Оно может наследоваться или устанавливаться *de novo*. Поддержание правильного уровня метилирования осуществляется процессами метилирования и активного либо пассивного деметилирования остатков цитозина в CpG-динуклеотидах. У млекопитающих активное деметилирование ДНК происходит посредством окисления наиболее часто встречающейся эпигенетической метки — 5-метилцитозина (mC) с последующим дезаминированием и удалением по пути эксцизионной репарации оснований ДНК. У растений же обнаружено семейство 5-метилцитозин-специфичных ДНК-гликозилаз, которые способны в одну стадию удалять mC из ДНК, посредством гидролиза его N-гликозидной связи.

В работе изучены механизмы узнавания mC и его окисленного производного 5-гидроксиметилцитозина (hmC) ДНК-гликозилазами MBD4 человека и REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1) табака. Были клонированы и выделены в рекомбинантном виде полноразмерный белок MBD4 человека, а также три его делеционных варианта MBD4Δ78, MBD4Δ187 и MBD4cat в которых удалена N-концевая последовательность, N-концевая последовательность и метил-CpG-связывающий домен MeCP2, либо оставлен лишь каталитический домен. С использованием субстратов с разнесёнными модифицированными и немодифицированными CpG-сайтами показано, что метилсвязывающий домен MeCP2 не конкурирует с каталитическим доменом за субстрат и не оказывает аутоингибирующего действия, однако снижает общую активность, вероятно, за счёт закрепления белка на CpG-сайтах в стороне от места модификации. С применением метода «остановленной струи» показано, что изолированный домен MeCP2 связывается с метилированными CpG-динуклеотидами по двухстадийному механизму.

Клонирован и выделен в рекомбинантном виде ROS1 табака. Показано, что его ДНК-гликозилазная активность удаляет из ДНК как остатки mC, так и hmC. Изучено влияние окислительного повреждения CpG-динуклеотидов на их деметилирование ROS1: введение oхoG рядом с mC в полуметилированном или полностью метилированном CpG-динуклеотиде увеличивало константу скорости реакции (k_{cat}) в 3–5,5 раза. Введение oхoG напротив mC оказывает умеренное влияние на изменение k_{cat} (увеличение в 1,3–1,9 раза).

Исследование поддержано грантом РНФ № 23-44-00050.

Роль продукта трансляции теломеразной РНК белка hTERP в протеостазе клеток

Рубцова М. П.^{1,2}, Корягина М. С.^{1,2}, Шамонова М. А.¹, Шляпина В. Л.²,
Матюшкина Д. С.³, Шендер В. О.^{1,4}, Бутенко И. О.³, Говорун В. М.³, Донцова О. А.^{1,2,5}

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

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

³ ФБУН НИИ СБМ Роспотребнадзора, Москва, Россия

⁴ ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

⁵ Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколтех, Москва, Россия

Концевые участки хромосом – теломеры – состоят из повторяющихся коротких последовательностей, защищающих клетки эукариот от потери генетической информации в результате проблемы репликации концевых участков и действия нуклеаз. Чрезмерное укорочение теломер свидетельствует о множестве раундов деления и активирует программу гибели, избавляя организм от клеток, содержащих мутации. Для поддержания пролиферативного потенциала клетки активируют фермент теломеразу, обратная транскриптаза которой достраивает теломерные повторы, используя собственный РНК-компонент в качестве матрицы. Долгое время теломеразную РНК относили к классу некодирующих РНК. Однако, в клетках человека обнаружены несколько изоформ, образующихся при экспрессии гена теломеразной РНК: наиболее представленная является компонентом теломеразы, а более длинная выступает в качестве мРНК, кодирующей белок hTERP. Белок hTERP участвует в регуляции аутофагии и апоптоза и способствует выживанию клеток в условиях стресса. Мы обнаружили, что отсутствие белка hTERP в клетках приводит к нарушениям ответа на стресс эндоплазматического ретикулума и UPR (unfolded protein response), а также активации аутофагии.

Можно предположить, что в обычных соматических клетках синтезируется длинная изоформа теломеразной РНК и белок hTERP, который способствует ответу клеток на различные стрессовые ситуации. В условиях активации пролиферации происходит переключение биогенеза теломеразной РНК и накопление более короткой изоформы, участвующей в активации теломеразы. Отсутствие белка сказывается в отсутствии ингибирования трансляции, и активации систем фолдинга белков и деградации неправильно свернутых белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ #21-64-00006.

Искусственная РНКаз DL412: клеточные мишени бактерий *S. enterica* и *S. aureus*

Григорьева А.Е., Тупицына А.В., Бардашева А.С., Рябова Е.С., Задворных Д.А.,
Королева Л.С., Сильников В.Н., Рябчикова Е.И.

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

Искусственная РНКаз DL412 (где D - DABCO (1,4-диазабисцикло[2.2.2]октан), L4 – тетраметиленовый линкер, 12 - додецильный остаток), помимо рибонуклеазной активности [1], обладает противовирусной, противомикробной и противогрибковой активностью, выявленной *in vitro* на широком спектре микроорганизмов [2]. Цель данного исследования: определить мишени для DL412 у грамотрицательной бактерии *S. enterica* и грамположительной *S. aureus* с помощью электронной микроскопии (ЭМ) ультратонких срезов. Препарат сравнения - ципрофлоксацин. Условия инкубации суспензий бактерий с препаратами определяли по данным микробиологических исследований (15 и 45 мин). Осадки клеток фиксировали 4% раствором параформальдегида. Образцы обезживали стандартным методом и заливали в эпон-аралдит. Ультратонкие срезы изучали в ЭМ Jem 1400 (Jeol, Япония), снимки получали с помощью камеры Veleta (EM SIS, Германия).

Соединение DL412 в течение 15 мин инкубации вызывало выраженные нарушения ультраструктуры бактерий. В клетках *S. enterica* исчезли четкие рибосомы, видимые в ПЭМ в интактных клетках; нуклеоид округлился и приобрел четкие «границы», нарушилась организация нитей ДНК. Прямым подтверждением взаимодействия DL412 с молекулярными компонентами *S. enterica* явилось отложение электронно-плотного вещества в периплазматическом пространстве (целостность внешней мембраны сохранена) и формирование сферических включений в цитоплазме. Мы полагаем, что «исчезновение» рибосом и изменения нуклеоида клеток *S. enterica* отражают разрушение РНК вследствие рибонуклеазной активности DL412. Характер повреждений клеток *S. aureus* DL412 был иным: вдвое увеличивалась толщина клеточной стенки, она разрыхлялась и теряла свою структуру; промежуточный слой расширялся, а цитоплазма становилась гомогенной, рибосомы не визуализировались.

Изменения ультраструктуры клеток бактерий *отражают специфические эффекты* DL412, которые связаны как с рибонуклеазной активностью соединения (преобладают в клетках *S. enterica*), так и с его амфифильной природой (преобладают у *S. aureus*). Инкубация бактерий с ципрофлоксацином приводит к другим изменениям морфологии клеток.

- 1.Burakova E., Kovalev N., Zenkova M., Vlassov V., Silnikov V. *Structure–activity relationships in new polycationic molecules based on two 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octanes as artificial ribonucleases*. *Bioorg. Chem.* – 2014. – v.57. -127-131.
- 2.Burakova E., Saranina I., Tikunova N., Nazarkina Zh. *И др., всего 10 человек. Biological evaluation of tetracationic compounds based on two 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane moieties connected by different linkers*. *Bioorg. Med. Chem.* – 2016. - v.24. - 6012–6020.

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

Мутационный и кинетический анализ полимеразной активности TdT человека

Сенчурова С. И.¹, Кузнецова А. А.¹, Тюгашев Т. Е.¹, Кузнецов Н. А.^{1,2}

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (TdT), принадлежащая к семейству X ДНК-полимераз, является уникальным ферментом, способным вести матрица-независимый синтез ДНК. TdT присутствует только в клетках позвоночных и отвечает за добавление случайных нуклеотидов к 3'-концу одноцепочечной ДНК на V-D и J-D стыке иммуноглобулинов и TCR генов рецепторов в ходе V(D)J рекомбинации. В отличие от матрица-зависимых полимераз, TdT не имеет ограничений, связанных с формированием комплементарных взаимодействий между входящим нуклеотидом и матричным основанием. Однако встраивание природных нуклеотидов происходит с разной эффективностью и процессивностью, и механизм, лежащий в основе этих различий, остается неизвестным. Также, следует отметить, что кинетический механизм действия матрица-независимых полимераз, включающий константы скорости образования фермент-субстратного комплекса, катализа, и последующей транслокации и/или диссоциации фермента, остается невыясненным, хотя для ряда матрица-зависимых ДНК-полимераз такие механизмы определены. В связи с этим в рамках данной работы проведен анализ полимеразной активности фермента TdT человека, установлены ключевые этапы ферментативного процесса, отвечающие за эффективное присоединение нуклеотидов к растущей цепи, изучена роль двухзарядных ионов металлов в этом процессе, а также установлена роль ряда аминокислотных остатков активного центра, влияющих на селективность присоединения dNTP.

В ходе данной работы проведен анализ архитектуры dNTP-связывающего кармана и сравнительный анализ аминокислотных последовательностей нуклеотидилтрансфераз из 469 видов организмов выявил несколько потенциально важных аминокислотных остатков активного сайта. Было обнаружено, что остатки D395 и E456 могут определять специфичность фермента по отношению к присоединяемому нуклеотиду [1]. Затем при помощи молекулярного моделирования и анализа кинетических параметров был проведен анализ влияния аминокислотных замен в активном центре TdT человека на субстратную специфичность и активность фермента. Для этого нами были получены мутантные формы TdT человека, содержащие замены D395N, D395E, E456N, D395K/E456Q, D395N/E456N и D395N/E456Q. Аналогичный подход был использован для анализа функциональной роли аминокислотных остатков R336, H342, D345, L397, F400, F404 и D472 TdT человека. Совокупность полученных результатов позволила установить влияние внесенных аминокислотных замен на структуру белка, этапы связывания с одноцепочечным ДНК-праймером и dNTP, а также на эффективность встраивания природных и неприродных нуклеозидтрифосфатов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что на активность TdT влияет как строение присоединяемого нуклеотида, иницирующего последовательные конформационные перестройки фермента в ходе образования каталитического комплекса, так и общий эффект нейтрализации заряда и расширения внутреннего объема в dNTP-связывающем кармане. Кроме того, установлено, что природа ионов металлов-кофакторов имеет ключевое значение для переключения между дистрибутивным и процессивным режимом удлинения праймера.

1. Kuznetsova A. A. et al. Substrate Specificity Diversity of Human Terminal Deoxynucleotidyltransferase May Be a Naturally Programmed Feature Facilitating Its Biological Function // *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. № 2 (25).

Работа поддержана грантом РФФ № 21-64-00017.

Биологически значимые катионы и биогенные амины контролируют конденсацию поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 *in vitro*

Суханова М. В.¹, Анарбаев Р. О.¹, Мальцева Е. А.¹, Кутузов М. М.¹, Лаврик О. И.¹

¹ Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины,
Новосибирск, Россия

Образование немембранных органелл или биомолекулярных конденсатов играет важную роль в регуляции функционирования клеточных процессов, в частности процесса репарации ДНК. При этом особое внимание уделяется поли(ADP-рибозе), которая наиболее вероятно инициирует образование конденсированных фаз в ходе репарации ДНК [1, 2]. Поли(ADP-рибоза) (PAR) представляет собой разветвленный полимер переменной длины, состоящий из звеньев ADP-рибозы. В клетке синтез PAR осуществляется ферментами PARPs, в частности PARP1, которая активируется в ответ на повреждение ДНК и катализирует собственную ковалентную модификацию путем авто-PAR-илирования, используя в качестве субстрата NAD⁺. Методами динамического рассеяния света и турбодиметрии нами было детально исследовано образование конденсатов с участием PAR-илированной PARP1 в системе *in vitro* и обнаружено, что PAR-илированная PARP1 способна к образованию межмолекулярных ассоциатов в присутствии двухвалентных металлов (Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺), играющих роль кофакторов в ферментативных реакциях, и полиаминов (спермидин³⁺ и спермин⁴⁺), выполняющими важную функцию в регуляции ДНК-зависимых процессов. Согласно нашим данным, конденсация PARP1 в процессе ее аутомодификации регулирует ее собственную активность, что сопровождается снижением уровня ее авто-PAR-илирования и образованием более низкомолекулярных продуктов в реакции синтеза поли(ADP-рибозы). Кроме того, образование конденсатов стимулирует активность поли(ADP-рибоза)-гликогидролазы, которая осуществляет гидролиз поли(ADP-рибозы) в составе PAR-илированной PARP1. Исследование образования конденсированных фаз с PAR-илированной PARP1 и факторов эксцизионной репарации оснований ДНК в системе *in vitro* показало, что магний-зависимая конденсация PAR-илированной PARP1 с факторами репарации ДНК, ДНК-полимеразой β и ДНК-лигазой 3, приводит к стимуляции синтеза ДНК с вытеснением цепи, но практически не влияет на стадию заполнения однонуклеотидной брешы и лигирование одноцепочечного разрыва ДНК.

Таким образом, конденсация PAR-илированной PARP1 может играть важную роль в формировании функциональных биомолекулярных конденсатов, связанных с системой репарации ДНК в клетке.

1. Singatulina A. S., Hamon L., Sukhanova M. V., Desforges, B., Joshi V. D., Bouhss, A., Lavrik O. I., Pastré, D. PARP-1 activation directs FUS to DNA damage sites to form PARG-reversible compartments enriched in damaged DNA. *Cell reports* – 2019- V. 27 – P. 1809-1821.
2. Alemasova, E. E., Lavrik, O. I. A sePARate phase? Poly (ADP-ribose) versus RNA in the organization of biomolecular condensates. *Nucleic Acids Res.* – 2022 – V. 50 – P. 10817-10838.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 20-14-00086.

Биологически активные фосфоаналоги метионина и S-аденозилметионина

Хомутов А. Р.¹, Руденко А. Ю.², Филонов В. Л.¹, Марьясина С. С.³, Жгун А. А.⁴,
Хомутов М. А.¹, Польшаков В. И.³

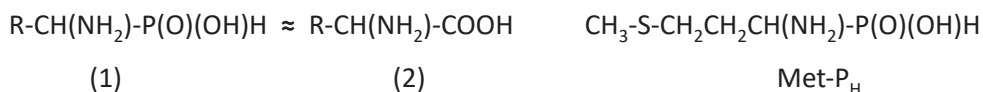
¹ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

² НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова,
Москва, Россия

³ Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М. В. Ломоносова,
Москва, Россия

⁴ ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Среди многочисленных и разнообразных по биологической активности и строению фосфорорганических аналогов аминокислот, α-аминоалкилфосфонистые кислоты (1) можно рассматривать как своеобразные изостеры природных аминокислот (2).



Замена НООС-группы метионина на одноосновный фосфонистый фрагмент -P(O)(OH)H имеющий сплюснутую тетраэдрическую конформацию, приводит к Met-P_H – высокоспецифическому антиметаболиту метионина. Met-P_H обладает хорошей антибактериальной и фунгицидной активностью, однако механизм его действия практически не исследован. Обсуждается взаимодействие Met-P_H с ферментами метаболизма метионина, а также взаимодействие фосфоаналогов S-аденозилметионина с некоторыми метилтрансферазами.

Работа поддержана грантом РНФ № 22-14-00291

Изучение влияния 2,6-дихлоро-9-(2,3,5-трибензоил-β-D-рибофуранозил) пурина на действие 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

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

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

В качестве второй линии терапии рака шейки матки, яичников и мелкоклеточного рака легкого в клинической практике используют ингибитор топоизомеразы 1 (Top1) – топотекан (Trc). Он стабилизирует ковалентные комплексы Top1-ДНК, возникающие в ходе каталитического цикла этого фермента, что приводит к накоплению повреждений ДНК и гибели клеток. Однако эукариотические клетки способны эффективно удалять такие повреждения за счет активности тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (Tdp1), что приводит к снижению эффективности Trc. Использование нетоксичных ингибиторов Tdp1 в дополнение к Trc является перспективной стратегией для повышения эффективности лечения этим препаратом.

В ходе скрининга серии липофильных производных нуклеозидов был обнаружен эффективный ингибитор Tdp1 – 2,6-дихлоро-9-(2,3,5-трибензоил-β-D-рибофуранозил) пурин (577) (IC₅₀ 820 нМ), который имел низкую собственную токсичность, а так же усиливал действие Trc на линиях клеток HeLa (рак шейки матки) в 4,8 раза, A549 (карцинома легкого) в 3 раза по сравнению с использованием Trc индивидуально в экспериментах методом МТТ. В рамках данной работы с помощью системы CRISPR-Cas9 были получены и охарактеризованы 3 пассируемые раковые клеточные линии с нокаутом по гену TDP1 на базе линии A549. В ходе изучения влияния Trc, соединения 577 и их комбинации на данные клеточные линии методом МТТ было показано, что при отсутствии Tdp1 усиления действия Trc при сочетанном применении с 577 не наблюдается. Это может свидетельствовать о том, что усиление действия Trc на клетках дикого типа происходит за счет ингибирования Tdp1. При применении комбинации Trc и ингибиторов Tdp1, исходя из механизма действия этих соединений, может наблюдаться увеличение уровня повреждений ДНК. Методом Alkaline Comet assay было показано, что уровень повреждений ДНК при использовании комбинации Trc и соединения 577 на клетках HeLa увеличивался по сравнению с индивидуальным применением Trc.

В экспериментах на моделях опухолей мышей (карцинома Кребс-2 и лимфома RLS) было показано достоверное снижение массы опухолей и числа метастазов при лечении животных комбинацией Trc и соединения 577 по сравнению с Trc в монорежиме.

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

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

ПОСТЕРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Полиморфизмы ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 и АП-эндонуклеазы APE1: их влияние на функции и белок-белковую координацию

Алексеева И. В., Кладова О. А., Давлетгильдеева А. Т., Бакман А. С., Кузнецов Н. А.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, 630090 Россия*

Процесс эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER) является одним из основных путей противодействия генотоксическим эффектам необъемных повреждений ДНК, которые ежедневно возникают в клеточном геноме. Участниками пути BER выступает ограниченное число ферментов, а именно ДНК-гликозилаза, специфичная к конкретному типу повреждения, АП-эндонуклеаза, ДНК-полимераза и ДНК-лигаза. На сегодняшний день известно, что в популяции людей присутствует большое количество полиморфных вариантов (SNP) данных ферментов. Литературные данные свидетельствуют о том, что аминокислотные замены, вызванные SNP, могут приводить не только к ухудшению функциональной активности конкретного фермента, но и быть причиной нарушения белок-белковых взаимодействий с другими участниками BER, что приводит к снижению эффективности процесса репарации ДНК. Установлено, что некоторые SNP ассоциированы с развитием различных заболеваний, от нейродегенеративных до онкологических. Цель данной работы состояла в экспериментальном определении влияния некоторых аминокислотных замен, вызванных SNP, на активность ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4, а также АП-эндонуклеазы APE1 человека. Для этого методом сайт-направленного мутагенеза были получены по четыре полиморфных варианта ДНК-гликозилаз SMUG1 (G90C, P240H, N244S, N248Y) и MBD4 (S470L, G507S, R512W, H557D), а также семь полиморфных вариантов APE1 (R221C, N222H, R237A, G241R, M270T, R274Q, P311S). Для прямой регистрации скорости накопления продуктов превращения ДНК-субстратов использовали метод гель-электрофореза в полиакриламидном геле. Стадии образования фермент-субстратных комплексов и катализа были проанализированы методом «остановленного потока», что позволило зарегистрировать конформационные превращения в молекулах ферментов и модельных ДНК-субстратах. Была определена способность ряда ферментов репарации ДНК человека (ДНК-гликозилазы OGG1, UNG2 и AAG; ДНК-полимераза β ; или вспомогательных белков XRCC1 и PCNA) влиять на активность APE1 дикого типа и его природных полиморфных вариантов. Использование данных подходов позволило определить влияние выбранных аминокислотных замен не только на самостоятельное функционирование ферментов, но и установить их роль в координации с другими ферментами BER.

Работа выполнялась при поддержке Гос. задания № 121031300041-4.

Изучение селективности действия эндонуклеазы Cas12a

Баранова С. В.¹, Черноносков А. А.¹, Коваль В.В.^{1,2}

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

Защиту от вторжения чужеродных геинетических (мобильных) элементов в геномную ДНК у бактерий и архей обеспечивают системы CRISPR/Cas. CRISPR/Cas представляет собой технологию манипулирования геномом и имеет широкий спектр применений. Различные виды этих систем включают в себя Cas9 и/или Cas12a-нуклеазы. В присутствии ионов двухвалентных металлов белки Cas9 и Cas12a узнают и расщепляют определенную последовательность ДНК. Нацеливание на субстрат обеспечивается направляющей РНК (crRNA), обладающей комплементарной ДНК последовательностью. Важное значение для расщепления целевой ДНК с помощью Cas9 и Cas12a имеет распознавание PAM-мотива, примыкающего к протоспейсеру.

К преимуществу Cas12a перед Cas9, можно отнести более короткие направляющие РНК, участвующие в формировании комплекса Cas12a/crRNA, и образование в процессе реакции расщепления более крупных делеций в целевых сайтах, что облегчает последующую вставку донорской ДНК.

Целью данной работы было изучение влияния положения в целевом ДНК-субстрате некомплементарной crRNA пары оснований на эффективность работы фермента. Для достижения поставленной цели была наработана, очищена и охарактеризована эндонуклеаза Cas12a, а также протестирована ее каталитическая активность на различных субстратах. В качестве ДНК-субстратов, были выбраны олигонуклеотиды, содержащие в разном положении основание, образующее некомплементарную пару при взаимодействии с направляющей РНК. Показано, что эффективность реакции расщепления таких олигонуклеотидов, отличается от эффективности расщепления субстрата полностью комплементарного crRNA.

Полученные данные могут стать основой для повышения селективности действия эндонуклеазы Cas12a в системах геномного редактирования, что может позволить улучшить применение систем CRISPR/Cas в генной инженерии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 20-14-00214.

Исследование генотоксического действия холодной плазмы в комбинации с наночастицами золота на клетки увеальной меланомы и аденокарциномы легкого человека *in vitro*

Бирюков М.М.^{1,2,3}, Крячкова Н.В.^{1,2,3}, Полякова А.А.^{1,2,3}, Милахина Е.В.³,
Закревский Д.Э.³, Швейгерт И.В.³, Коваль О.А.^{1,2,3}

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

² Новосибирский государственный университет, Россия

³ Институт теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН,
Новосибирск, Россия

Холодная плазма – перспективный подход к противоопухолевой терапии, основанный на индукции в опухолевых клетках окислительного стресса. Активные формы кислорода и азота, образующиеся при обработке плазмой клеток, способны приводить к окислительным повреждениям, одно- и двухпочечным разрывам в геномной ДНК, однако опубликованные данные противоречивы и не позволяют сделать вывод о генотоксичности холодной плазмы.

Целью настоящей работы было исследование характера повреждений ДНК после облучения холодной плазмой в комбинации с наночастицами золота клеток увеальной меланомы и аденокарциномы легкого человека, а также изучение кинетики репарации ДНК.

В работе использовали газоразрядное устройство, разработанное коллективами из Института теоретической и прикладной механики СО РАН и Института физики полупроводников СО РАН. В качестве клеточных моделей использовали клетки персонализированной культуры увеальной меланомы uMel1 и аденокарциномы легкого человека A549.

В ходе проведенного ранее анализа транскриптома облученных плазмой клеток была показана активация сигнальных путей, связанных с ответом на повреждение ДНК и остановкой клеточного цикла в фазе G2/M. Методом вестерн-блота была исследована динамика изменения уровня фосфорилированной формы гистона H2A – маркера двухпочечных разрывов ДНК. Через 3 часа после обработки уровень фосфорилированного белка в образцах лизатов клеток достоверно не изменялся, через 24 ч после обработки плазмой наблюдалось накопление этого белка. При помощи щелочного варианта метода ДНК-комет, позволяющего детектировать одновременно одно- и двухпочечные разрывы, исследовалась кинетика репарации ДНК после обработки холодной плазмой. Так, для клеток A549 показано увеличение доли поврежденной ДНК уже через 1 ч после обработки плазмой с 8% в контрольных образцах до 26% в образцах облученных клеток. Далее, через 3 и 6 часов после облучения эта доля снижается до 19 и 14% соответственно, а через 24 ч достигает уровня в необработанных клетках. Добавление наночастиц золота, покрытых полиэтиленгликолем, сразу после обработки, приводит к снижению доли поврежденной ДНК.

Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что холодная плазма является слабым генотоксическим агентом, приводящим к появлению, преимущественно, однопочечных разрывов ДНК, которые репарируются в течение суток после обработки.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 23-14-00285.

Разработка бор-содержащих мультифункциональных наноконструкций на основе модифицированных форм альбумина для тераностики злокачественных опухолей

Ван М.¹, Рогалева В.И.², Захарова О.Д.², Дымова М.А.², Сильников В.Н.², Годовикова Т.С.^{1,2}, Аврамчук Т.В.^{1,2}.

¹ Новосибирский государственный университет,

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Создание эффективных методов лечения раковых опухолей до сих пор является актуальной задачей. При этом преследуются решения как минимум двух проблем. Первая из них – грамотное нацеливание терапевтического средства на опухоль– мишень, что обеспечивает эффективное накопление терапевтического агента в опухоли, а значит уменьшает дозу и системную токсичность препарата. Вторая проблема – преодоление устойчивости опухолей к терапии. Необходима простая и достаточно дешёвая стратегия, в рамках которой, небольшим варьированием отдельных ее блоков, можно будет создавать разнообразные препараты, совмещающие селективность воздействия на пораженную ткань, два и более вида терапии и возможность визуализации внутри организма.

Наша работа посвящена конструированию на платформе человеческого сывороточного альбумина тераностиков, содержащих химиотерапевтические агенты (ауристатины, гемцитабин), атомы бора для проведения бор-нейтронозахватной терапии (в составе кластеров клозо-додекаборана, или бис(дикарболида) кобальта) и сигнальные метки (флуоресцентные остатки и атомы фтора). Остаток Cys-34 в составе HSA был задействован нами для введения флуоресцентной метки. Посредством гомоцистеинового фрагмента в состав конструкций были введены остатки содержащие атомы фтора или борные кластеры, меркапто-группы гомоцистеиновых фрагментов были задействованы под присоединение химиотерапевтических молекул. Успешное получение тераностиков подтверждено различными физико-химическими методами. Изучена цитотоксичность полученных конструкций в отношении рака молочной железы и глиообластомы человека.

Авторы выражают благодарность Москалеву И.А. (НГУ), Таскаеву С.Ю., Касатовой А.И. (ИЯФ СО РАН) и Объединенному Центру геномных, протеомных и метаболомных исследований (ИХБФМ СО РАН).

Работа выполнена в рамках Государственного задания 121031300042-1.

Получение и сравнение биохимических свойств РНКаз III *Thermus thermophilus* и *Geobacillus stearothermophilus*

Воронин А.А.^{1,2}, Оскорбин И.П.¹, Филипенко М.Л.¹

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

² Новосибирский национальный исследовательский университет,
Новосибирск, Россия

РНКазы Н гидролизуют фосфодиэфирную связь между соседними рибонуклеотидами или между рНМФ и дНМФ в дуплексах РНК:ДНК. В клетках они участвуют в удалении РНК-праймеров из ДНК, в разрешении R-петель и в удалении единичных рНМФ, ошибочно включенных ДНК-полимеразами в состав ДНК. По субстратной специфичности РНКазы Н делятся на два типа, к первому из которых относятся РНКазы HI и HII, ко второму — РНКазы HIII. В отличие от РНКаз Н первого типа РНКазы HIII способны гидролизовать фосфодиэфирную связь между единичным рНМФ и дНМФ в цепи дцДНК. С практической точки зрения из двух типов РНКаз Н наиболее интересными являются РНКазы HIII из термофильных микроорганизмов. Эти ферменты могут использоваться для повышения специфичности ПЦР и детекции продуктов реакции в методах изотермической амплификации нуклеиновых кислот, в том числе в LAMP. На данный момент разнообразие РНКаз HIII изучено слабо, уже выделенные ферменты описаны фрагментарно, и до сих пор не проводилось прямого сравнения РНКаз HIII из разных микроорганизмов.

В настоящей работе было проведено клонирование, очистка и сравнение биохимических свойств РНКаз HIII *Thermus thermophilus* и *Geobacillus stearothermophilus*. При сравнении биохимических свойств определяли удельную активность ферментов, а также оптимальную температуру, pH, состав реакционного буфера, включая соли и дивалентные кофакторы. Удельная активности в реакционном буфере для РНКазы HIII *E. coli* составила 5×10^4 ед. акт./мг для РНКазы HIII *Geobacillus stearothermophilus* и 5×10^3 ед. акт./мг для РНКазы HIII *Thermus thermophilus*. Определены оптимальные условия для работы РНКазы HIII *Thermus thermophilus* (>60 °C, pH 9,5 (предварительно), 25 mM KCl, 3 mM Mg²⁺) и *Geobacillus stearothermophilus* (50 °C, pH 9,5 (предварительно), 50 mM NH₄Cl, 1 mM Mn²⁺). Показано, что РНКазы HIII *Thermus thermophilus* имеет температурный оптимум не менее 60 °C предпочтительно использует ионы магния в качестве кофактора, что делает этот фермент перспективным кандидатом для детекции результатов LAMP с помощью гидролизующих зондов. В дальнейшем планируется провести клонирование и описание биохимических свойств РНКаз HIII из других термофильных организмов с целью выбора оптимального фермента для практических приложений.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300056-8.

Влияние замен аминокислотных остатков в области активного центра ДНК-диоксигеназы человека АВН2 на эффективность деметилирования ДНК

Давлетгильдеева А. Т.¹, Тюгашев Т. Е.¹, Джао М.², Кузнецов Н. А.¹, Кузнецова А. А.¹

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов является важным путем контроля реализации генетической информации живыми организмами. Сайт-специфическое метилирование ДНК представляет собой один из важнейших путей обеспечения данного процесса. Контроль уровня метилирования за счет удаления метильных групп из ДНК, главным образом, катализируется негемовыми Fe(II)/ α -кетоглутарат-зависимыми ДНК-диоксигеназами. Диоксигеназы семейства AlkB представляют собой ферменты репарации, которые катализируют прямое удаление алкильных групп из оснований ДНК, таких как 3-метилцитидин (m^3C), 1-метиладенозин (m^1A), 1,N⁶-этенoadенозин и другие. Однако ферменты семейства AlkB (включая ферменты человека АВН2 и АВН3) способны окислять такие эпигенетические модуляторы как 5-метилцитидин (m^5C), 5-гидроксиметилцитидин и др. *in vitro*. При этом переключение между анти-конформацией (m^3C) и син-конформацией (m^5C) может иметь ключевое значение для осуществления каталитического окисления метильных групп в активном центре фермента.

В ходе данного исследования проводили ремоделирование активного центра ДНК-диоксигеназы человека АВН2 посредством внесения в него точечных мутаций для получения вариантов, обладающих свойствами, отличными от фермента дикого типа. На основании анализа структурных данных был отобран ряд аминокислотных остатков, предположительно способных формировать водородные связи с метилированными основаниями (в том числе с m^5C) или приводить к стерическим затруднениям в процессе выворачивания модифицированного основания в активный центр фермента. Функциональное картирование кармана, связывающего повреждение, было выполнено путем анализа роли таких аминокислотных остатков как Val99, Arg110, Tyr122, Phe124, Ser125, Ile168, Arg172, Asp173 и Glu175, в механизме распознавания поврежденного основания. Взаимодействие АВН2 дикого типа или его мутантов, содержащих замену одного из перечисленных аминокислотных остатков на аланин, с поврежденной ДНК, содержащей метилированное основание m^1A или m^3C или эпигенетический маркер m^5C , анализировали с помощью моделирования молекулярной динамики и кинетических анализов. Сравнительный анализ ферментов выявил влияние замен на связывание ДНК и каталитическую активность. В совокупности эти данные проливают свет на молекулярные и кинетические последствия замены остатков активного центра на механизм распознавания субстрата.

Исследование проведено при поддержке государственного задания № 121031300041-4.

Метод определения состава белковой короны на липидных наночастицах при инкубации с сывороткой крови

Епанчинцева А. В., Полетаева Ю. Е., Баранова С. В., Бахно И. А., Рябчикова Е. И.,
Довыденко И. С.

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

Лекарственные, вакцинные и диагностические препараты на основе наночастиц (НЧ) находят все большее применение в медицине, однако, их разработки и внедрение в практику осложняются влиянием на их поведение белковой короны, которая формируется вокруг НЧ при попадании в любую биологическую среду. Корона состоит из двух принципиально разных слоев: жесткой, необратимо связанной с поверхностью НЧ, и мягкой короны, белковый состав которой вариабелен и легко изменяется при минимальных воздействиях. Установлено, что компоненты мягкой короны, а не химический состав поверхности НЧ, определяют характер взаимодействия НЧ с клетками и физиологическими жидкостями организма. Очевидно, что знание точного состава мягкой короны необходимо не только для понимания особенностей поведения нанопрепаратов в организме, но и для «управления» этим поведением. Опубликованы сотни работ по изучению физико-химических свойств и состава белковой короны, однако, на текущий момент не описано ни одного метода, позволяющего установить реальный белковый состав мягкой короны.

Отсутствие метода определения белкового состава мягкой короны является научной проблемой, решение которой позволит определять влияние физико-химических параметров НЧ на состав короны; изучать роль отдельных компонентов мягкой короны во взаимодействии НЧ с клетками; «программировать» поведение НЧ в организме человека, и многое другое. Помимо прочего, метод определения белкового состава мягкой короны позволит решать задачи персонализированной медицины, связанные с диагностикой и подбором индивидуальных средств терапии, в частности, онкологических и наследственных заболеваний.

Мы предложили комбинированный подход к выделению корона-несущих НЧ. В качестве экспериментальной модели мы использовали систему 10% эмбр. сыворотка – многоуровневые наноконструкции (МУНК), созданные нами и детально изученные ранее [1]. Использование МУНК и бифункционального кросс-сшивающего агента позволяет фиксировать белковые компоненты короны на поверхности МУНК и бережно отмывать НЧ с полной короной от несвязавшихся белков. Предложенная нами методика позволяет установить состав полной белковой короны на поверхности липидных наночастиц.

1. Epanchintseva A. V. et al. A lipid-coated nanoconstruct composed of gold nanoparticles noncovalently coated with small interfering RNA: Preparation, purification and characterization // *Nanomaterials*. – 2021. – V. 11. – №. 11. – P. 2775.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 22-15-00228.

Синтез комбинированных гликоглицеролипидов с потенциальной противоопухолевой активностью

Липенский М.М., Морозова Н.Г., Маслов М.А.

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

Рак остается одной из главных проблем здравоохранения во всем мире. Способность опухолевых клеток приобретать устойчивость к клинически применяемым препаратам снижает эффективность противоопухолевой терапии [1]. Поэтому возникла необходимость в создании комбинированных противоопухолевых препаратов, включающих несколько фрагментов, обладающих различным механизмом противоопухолевого действия, что при воздействии клеточных эстераз приведет к образованию активных химиотерапевтических агентов [2].

Гликоглицеролипиды активируют неапоптотическую гибель опухолевых клеток. Было показано, что и лизогалактоглицеролипид проявляет антинеопластическую активность, сравнимую с эдельфозином. В качестве заместителей во втором положении глицерина выступали жирные кислоты: олеиновая (ненасыщенная) и каприновая (насыщенная). Олеиновая кислота известна своим антипролиферативным эффектом при различных видах рака, включая колоректальный рак, где она индуцирует апоптоз, а также рак молочной железы. Каприновая кислота ингибирует пролиферацию колоректальной карциномы человека (HTC-116), эпидермоидной карциномы кожи человека (A-431) и аденокарциномы молочной железы человека (MDA-MB-231). Пальмитолеиновая кислота может ингибировать рост и распространение опухолевых клеток как и её аналоги (пальмитиновая, олеиновая кислоты) за счёт её противовоспалительного и антиоксидантного действия против различных форм рака, таких как рак молочной железы, простаты и толстой кишки[3].

В настоящей работе нами был осуществлен синтез новых комбинированных алкил-ацильных гликоглицеролипидов в ряду галактозы и маннозы, включающих остатки олеиновой и пальмитолеиновой кислот по 6-му положению углеводной составляющей и каприновой и олеиновой кислот по 2-му положению глицериновой составляющей.

1. Idowu T. et al. Design, synthesis and antitumor properties of glycosylated antitumor ether lipid (GAEL)- chlorambucil-hybrids // *Chem. Phys. Lipids*. 2016. Vol. 194. P. 139–148.
2. Е. А. Варламова, А. К. Исагулиева, Н. Г. Морозова, Е.В. Шмендель, М.А. Маслов, А. А. Штиль. Бесфосфорные липиды - новые прототипы противоопухолевых лекарств // *Биоорганическая химия*. - 2021. - №47 (5). - С. 1-16.
3. Hu W. et al. A review of biological functions, health benefits, and possible de novo biosynthetic pathway of palmitoleic acid in macadamia nuts // *J. Funct. Foods*. 2019. Vol. 62. P. 103520.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (гос. задание № FSFZ-2023-0004)

Фотоиндуцированное окисление ансерина и карнозина: кинетика эволюции и магнитные характеристики короткоживущих радикалов

Морозова О. Б.¹, Фишман Н. Н.¹, Журавлева Ю. С.^{1,2}, Юрковская А. В.¹

¹ Институт «Международный томографический центр», Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Ансерин (β -аланил-1-метилгистидин) и карнозин (β -аланил-гистидин) являются важными функциональными дипептидами, привлекающими внимание исследователей из-за их большого физиологического значения, в частности, антиоксидантной и радиопротекторной функции, буферных свойств, реакционной способности по отношению к цитотоксичным альдегидам. Однако до сих пор нет полного понимания молекулярных механизмов, отвечающего за функции ансерина и карнозина. Актуальным является исследование роли свободных радикалов имидазола в механизме реакций, как потенциальных интермедиатов в окислительно-восстановительных реакциях с участием ансерина и карнозина. Эндогенные фотосенсибилизаторы (такие как флавины, порфирины, птерины) или экзогенные фотосенсибилизирующие препараты, образующие триплетные возбужденные состояния, могут индуцировать перенос электрона от ансерина и карнозина, что приводит к формированию свободных радикалов. Короткое время жизни и отсутствие хромофорных групп затрудняет их изучение методом ЭПР и оптической спектроскопии. Нами исследовано фотоиндуцированное окисление ансерина и карнозина методом лазерного импульсного фотолиза, позволяющего определять константы скорости тушения триплетов, и методом химической поляризации ядер (ХПЯ) с временным разрешением, который является высокочувствительным косвенным методом детектирования короткоживущих радикалов с помощью ЯМР-спектроскопии. ХПЯ возникает в ходе селективной по ядерному спину синглет-триплетной эволюции короткоживущих радикальных пар, генерируемых фотохимически. Этот метод позволяет проследить кинетику эволюции короткоживущих радикалов, а также определить константы сверхтонкого взаимодействия (СТВ) для магнитных ядер. В качестве фотосенсибилизаторов использовались 3,3',4,4'-тетракарбоксибензофенон и 2,2'-дипиридил. Образование радикальных пар в результате тушения было доказано наблюдением эффектов ХПЯ в широком диапазоне pH водных растворов. Было обнаружено, что кинетика эволюции и константы СТВ радикалов ансерина зависят от протонированного состояния аминогруппы нереакционного остатка β -аланила, а для карнозина влияние заряда аминогруппы незначительно. Для сравнения с ансерином были получены комплементарные данные для фотоиндуцированных реакций 1- и 3-метилгистидина, и были найдены существенные отличия в реакционной способности, ее зависимости от pH и СТВ образующихся радикалов. Результаты для карнозина качественно совпали с полученными ранее для гистидина. Таким образом, в результате работы установлено, что радикалы ансерина проявили свойства, отличные от свойств радикалов карнозина и 1-метилгистидина.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 23-73-10103.

Характеризация лед-связывающих белков и установление их вторичной структуры

Олейник Г. А.¹, Зиновьева Д. В.^{1,2}, Баранова С. В.¹

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

С момента открытия лед-связывающих белков у арктических рыб прошло уже более 50 лет. В последствии антифризные белки были обнаружены в различных видах организмов: рыбах, насекомых, покрытосеменных растениях, диатомовых водорослях и микробах. Главной особенностью лед-связывающих белков, которые еще иногда называют ледоструктурными, является способность связываться со льдом. Наличие антифризных белков в организме предотвращает повреждение клеток при образовании кристаллов льда и позволяет выживать при температурах ниже точки замерзания воды. Они могут ингибировать рост кристаллов, участвовать в рекристаллизации, а также понижать температуру замерзания воды.

Лед-связывающие белки нашли применение в различных отраслях, таких как сельскохозяйственная, пищевая, авиационная промышленности, дорожное хозяйство и медицина. В пищевой промышленности антифризы, например, применяют для сохранения качества и вкуса мороженого и прочих охлажденных и/или замороженных продуктов. В дорожном хозяйстве лед-связывающие белки можно использовать для обработки дороги против обледенения, а в сельском хозяйстве – для повышения морозостойкости посевного материала. Для создания экономически выгодных синтетических аналогов важно понимание механизма взаимодействия ледоструктурных белков со льдом и установление их вторичной структуры.

В работе исследовались рекомбинантные лед-связывающие белки, найденные у рыб вида *Myoxocephalus octodecemspinosus* и *Brachyopsis segaliensis*. Полноразмерная структура данных белков, подтвержденная инструментальными методами анализа, отсутствует. Поэтому целью данного исследования была характеристика данных лед-связывающих белков и установление их вторичной структуры методами кругового дихроизма и масс-спектрометрии. Для достижения цели решались следующие задачи: получить рекомбинантные белки, охарактеризовать их биохимическими и биофизическими методами. Установлено, что структуры исследованных белков различаются: у белка из рыбы *Myoxocephalus octodecemspinosus* преимущественно α -спиральная структура, для структуры белка из *Brachyopsis segaliensis* характерны α -спиральные и β -складчатые структурные типы. Показано, что белки образуют олигомерные формы разного порядка, что видимо повышает эффективность их взаимодействия со льдом. Методом гомологии построены две теоретические модели этих белков.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 23-24-00256.

Клонирование новых бактериальных поли(А)-полимераз

Оскорбин И.П.¹, Кунова М.С.¹, Филипенко М.Л.¹

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

Поли(А)-полимеразы (PAPs, poly(A) polymerases) — ферменты, добавляющий полиА-хвосты к 3'-концам РНК безматричным способом. Эти ферменты относятся к суперсемейству нуклеотидилтрансфераз и присутствуют как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. У эукариот длина полиА-хвостов мРНК определяет время жизни мРНК в клетке. Согласно современным представлениям, у бактерий полиаденилирование способствует деградации РНК, однако детали этого процесса требуют дальнейших исследований. PAP широко используются в различных практических приложениях: секвенировании и мечении РНК, производстве РНК-вакцин, стабильность которых внутри клеток обеспечивается в том числе наличием поли(А)-хвостов. Таким образом, PAP интересны как для фундаментальной науки, так и в качестве компонента различных протоколов анализа РНК и производства терапевтических РНК-препаратов. Многообразие поли(А)-полимераз из разных бактерий остаётся слабоизученным, что отчасти обусловлено необходимостью прямых биохимических экспериментов для установления субстратной специфичности ферментов, наращивающих 3'-конец молекул РНК. Изучение многообразия бактериальных PAP может предоставить важную информацию о биохимических свойствах этих ферментов из разных организмов. Кроме того, вновь описанные бактериальные PAP могут стать ценными ферментами для практических приложений, превзойдя PAP I *E. coli* или поли(А)-полимеразу дрожжей.

Целью настоящей работы является описание новых поли(А)-полимераз и системное сравнение их биохимических свойств с уже известными аналогичными ферментами. Для этого были отобраны несколько кандидатных PAP из нескольких бактерий: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Hydrogenobacter thermophilus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Marinobacter lipolyticus*, *Proteus mirabilis*, *Thermocrinis albus*, *Thermus thermophilus*. Отбор кандидатных PAP производили по гомологии с хорошо описанной PAP *E. coli* не менее 40% и аннотации как PAP или нуклеотидилтрансферазы. Выбранные кандидатные PAP клонировали в вектор pET23a для экспрессии в *E. coli*. Кандидатные PAP *Hydrogenobacter thermophilus* и *Marinobacter lipolyticus* были наработаны в *E. coli* и очищены с помощью хроматографии. Кандидатная PAP *Hydrogenobacter thermophilus* не проявила специфической ферментативной активности, не элонгировала в присутствии АТФ 20-звенный РНК-олигонуклеотид, меченный FAM. Кандидатная PAP *Marinobacter lipolyticus* проявила слабую специфическую ферментативную активность. В дальнейшем планируется очистить и описать биохимические свойства всех клонированных PAP, а также опробовать их в практических приложениях: приготовление NGS-библиотек для секвенирования РНК и полиаденилировании модельных мРНК.

Исследование было поддержано грантом РФ № 24-24-00389.

Синтез магнитных наночастиц, покрытых человеческим сывороточным альбумином

Петров К. Д.¹, Митин Д. Е.¹

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

В последние десятилетия интенсивно разрабатываются методы диагностики и терапии с применением наночастиц на основе оксида железа (II,III). К существенным преимуществам частиц магнетита стоит отнести возможность таргетной доставки под действием внешнего магнитного поля, лечения с помощью гипертермии и диагностики методом магнитно-резонансной томографии [1].

В нашей работе мы преследовали цель создания нанокомпозита магнетита и человеческого сывороточного альбумина. Альбуминовое покрытие приводит к повышенному проникновению в клетки, увеличению эффективности доставки в опухолевые ткани, ослаблению иммунного ответа и стабилизации поверхности [2]. В результате работы методом со-осаждения солей Fe(II) и Fe(III) были получены наночастицы магнетита стабилизированные жирными кислотами и полисорбатом. Их поверхность далее была загружена человеческим сывороточным альбумином. Показано, что наибольшая сорбция человеческого сывороточного альбумина на НЧ наблюдается при pH 7,4 и приводит к увеличению размеров НЧ до 150–200 нм. Покрытие альбумином приводит к дополнительному снижению цитотоксичности НЧ. Продemonстрировано, что НЧ, покрытые альбумином, имеют значения r_2/r_1 7,5–15,3, что говорит о возможности их использования для регистрации T_2 -взвешенных изображений. Исследована эффективность взаимодействия полученных наноматериалов с противоопухолевым препаратом доксорубицином (DOX): емкости по антибиотику составили 370–725 мкг/мг. Конструкции НЧ–DOX ингибируют рост клеток A549. IC50 составил ~0,7 мкг DOX/мл.

1. Materón, E. M., Miyazaki, C. M., Carr, O., Joshi, N., Picciani, P. H. S., Dalmaschio, C. J., Davis, F., Shimizu, F. M. *Magnetic nanoparticles in biomedical applications: A review // Appl. Surf. Sci. Adv.* – 2021. – Vol. 6.
2. Zaloga, J., Janko, C., Nowak, J., Matuszak, J., Knaup, S., Eberbeck, D., Tietze, R., Unterweger, H., Friedrich, R. P., Duerr, S., Heimke-Brinck, R., Baum, E., Cicha, I., Dörje, F., Odenbach, S., Lyer, S., Lee, G., Alexiou, C. *Development of a lauric acid/albumin hybrid iron oxide nanoparticle system with improved biocompatibility // Int. J. Nanomedicine.* – 2014. – Vol. 9. – P. 4847–4866.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №21-74-00120 и государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1

Физико-химические характеристики поликатионного амфифила DL412 в ДМСО и водных растворах

Рябова Е. С., Задворных Д. А., Бауэр И. А., Сильников В. Н., Рябчикова Е. И.

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

Поликатионный амфифил DL412 (где D – DABCO (1,4-дизабицикло[2.2.2]октан), L4 – тетраметиленовый линкер, 12 – додецильный остаток) [1] активен против широкого спектра микроорганизмов *in vitro*. Для микробиологических исследований соединения DL412 готовят в диметилсульфоксиде (ДМСО) и разводят питательной средой.

Задача данного исследования: выявить изменения физико-химических характеристик соединения DL412 при разведении 0,9 % раствором NaCl и бульоном Мюллера-Хилтона (МХБ); при инкубации с 0,9 % NaCl в течение 12 ч. Методы: динамического светорассеяния (ДСР, Zetasizer Nano-ZS, Malvern, UK); просвечивающая электронная микроскопия (ЭМ); негативное контрастирование 0,5 % водным раствором уранила ацетата. Образцы изучали в ЭМ Jem 1400 (Jeol, Япония), снабженном цифровой камерой Veleta (EM SIS, Германия).

Метод ДСР выявил присутствие частиц в образцах ДМСО и DL412. С ростом концентрации DL412 в 0,9 % NaCl с 0,005 мМ до 1 мМ диаметр частиц возрастал с $516,6 \pm 113$ нм до 1527 ± 205 нм. В МХБ при концентрации 1 мМ диаметр частиц DL412 составил $1313,0 \pm 174,1$ нм.

Исследование в ПЭМ образца ДМСО выявило округлые частицы низкой электронной плотности двух типов: 1. размерами от 20 до 80 нм; 2. от 10 до 20 нм.

При смешивании с дистиллированной водой частицы ДМСО увеличивались в размерах и уплотнялись. В смеси с 0,9 % NaCl (1:100) наблюдались частицы ДМСО типов 1 и 2, а также крупные электронно-плотные частицы, поверхность которых «декорирована» частицами низкой электронной плотности (4–7 нм).

Соединение DL412 в ДМСО (20 мМ) представлено мелкими электронно-плотными частицами размером 1,7–2 нм; образец также содержит частицы ДМСО типа 1.

В смеси DL412 (20 мМ в ДМСО) с 0,9 % NaCl (1:100) наблюдались частицы DL412, организованные в плоские кристаллоидные структуры округлой формы. Смесь также содержала «декорированные» частицы ДМСО и частицы ДМСО типа 1 и 2. Ряд частиц типа 1 окружены «коронай» из частиц DL412. Кристаллоидные структуры DL412 наблюдались также в МХБ.

Инкубация в течение 6 ч смеси DL412 с 0,9 % NaCl не приводит к видимым изменениям структур. Через 12 ч инкубации увеличиваются размеры «декорированных» и «коронованных» частиц ДМСО.

Таким образом, все исследованные образцы, содержащие ДМСО и DL412, не являются гомогенными, они структурированы. Соединение DL412 присутствует в виде частиц размером 1,7–2 нм и способно формировать кристаллоидные структуры в разных средах.

1. Burakova E., Kovalev N., Zenkova M., Vlassov V., Silnikov V. Structure–activity relationships in new polycationic molecules based on two 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octanes as artificial ribonucleases. *Bioorg. Chem.* – 2014. – v.57. – 127–131.

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

***In vitro* разработка онколитического препарата на основе вируса везикулярного стоматита**

Ряполова А.В.¹, Минская Е.С.¹, Гасанов Н.Б.¹, Мороз В.Д.¹, Иматдинов И.Р.²,
Иматдинов А.Р.², Карабельский А.В.¹

¹ Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

² ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»,
Новосибирск, Россия

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности в развитых странах. Внедрение в клиническую практику методов иммунотерапии позволило значительно увеличить эффективность лечения ряда онкологических заболеваний. Онколитические вирусы это принципиально новый класс лекарственных средств на основе рекомбинантных вирусов, способных специфично размножаться в опухолевых клетках, уничтожать их и активировать иммунную систему пациента, не поражая при этом здоровые клетки человека [1].

Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита (rVSV) является многообещающей, эффективной и безопасной платформой для достижения этих целей.

rVSV были получены путем контрансфекции плазмиды, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP) или слитый вариант белка интерлейкина-12 и грануляционно-макрофагального колониестимулирующего фактора мыши (mIL12-mGMCSF), и хелперными плазмидами. 24 часа после инфекции rVSV клеточных линий B16-F10, SCC VII, LL/2 и H22 in vitro, суспензии клеток были проанализированы на количество живых/мертвых клеток методом проточной цитометрии. В ходе экспериментов было установлено, что наиболее чувствительной к действию вируса является клеточная линия H22, в то время как SCC VII – наименее чувствительна ввиду различий в уровне экспрессии поверхностных рецепторов клеточных линий, обеспечивающих проникновение VSV в клетку. Эти различия могут быть критичными при использовании rVSV для лечения рака разной этиологии.

1. Bell J., McFadden G. *Viruses for tumor therapy //Cell host & microbe.* – 2014. – Т. 15. – №. 3. – С. 260-265.

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение 075-10-2021-093, проект GTH-RND-2113.

Изменённая селективность мутантных форм терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы

Тюгашев Т. Е.¹, Укладов Е. О.^{1,2}, Кузнецов Н. А.^{1,2}

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (TdT), характерный для позвоночных представитель семейства PolX ДНК-полимераз, обладает способностью к безматричному 3'-5' синтезу ДНК. Эта особенность, обусловленная удлинённой формой петли 1, отражает участие TdT в V(D)J-рекомбинации, механизме обеспечивающем разнообразие антител и Т-клеточных рецепторов в В- и Т-клетках, нашла применение в биотехнологии — в методе детекции апоптоза TUNEL, в мечении 3'-концов ДНК, в ферментативном синтезе олигонуклеотидов. При этом безматричная полимеразная активность не является полностью случайной, человеческая TdT показывает выраженную селективность дГТФ >> дТТФ ≈ дАТФ > дЦТФ при присоединении нуклеотидов к оцДНК-праймеру, что может выступать затруднением при ДНК-синтезе.

Молекулярно-динамические расчеты позволили предложить объяснение для наблюдаемой селективности, коррелирующей с динамикой существования водородных связей в модели комплекса между белком дикого типа и азотистым основанием присоединяемого нуклеотида.

Основываясь на этих результатах, сравнении последовательностей ортологов и анализе литературных данных по структуре и активности паралогов, был произведен подбор и моделирование мутантных форм для TdT человека, предположительно обладающих измененной субстратной селективностью, в составе D395E, D395N, D395Q, D395K, E456Q, E456N, D395N+E456N, D395Q+E456N, D395K+E456Q. Первый из выбранных аминокислотный остаток расположен в подвижной петле 1, взаимодействуя и с встраиваемым азотистым основанием, и с 3'-концом ДНК-праймера, второй же находится в активном центре фермента и взаимодействует с азотистым основанием присоединяемого нуклеотида. Согласно выполненным молекулярно-динамическим расчетам, в комплексе мутантной формы D395E, соответствующей широко распространенному среди ортологов варианту, уменьшилось количество контактов между белком и дГТФ. Тогда как в комплексах мутантных форм D395N и E456N сформировалось в среднем до одной дополнительной водородной связи между белком и азотистым основанием для дАТФ, дЦТФ и дТТФ, до двух дополнительных водородных связей — для мутантных форм TdT D395N+E456N, D395Q+E456Q и D395Q+E456N, среди которых форма D395N+E456N продемонстрировала наибольшее время существования водородных связей в течение симуляции. Таким образом, данные мутантные формы обладают «уравненным» числом контактов между белком и всеми дНТФ, что позволяет сделать заключение об изменении селективности по отношению к присоединяемому нуклеотиду.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-64-00017 и с использованием ресурсов ИВЦ НГУ.

Кинетика восстановления короткоживущих радикалов тимина и аденозина ароматическими аминокислотами

Фишман Н. Н.¹, Морозова О. Б.¹, Юрковская А. В.¹

¹ Институт «Международный томографический центр» СО РАН,
Новосибирск, Россия

Растущий интерес к исследованиям процессов одноэлектронного окисления оснований ДНК в присутствии эндогенных и экзогенных фотосенсибилизаторов обусловлен накапливающимися доказательствами того, что именно такие разрушительные процессы протекают в живой клетке. Реакции переноса электрона происходят преимущественно с участием гуанина – азотистого основания нуклеиновых кислот с наименьшим окислительным потенциалом. Однако имеются данные, что в ряде случаев в олигонуклеотидах с низким содержанием или отсутствием гуанина протекают фотореакции с участием других оснований ДНК, в том числе тимина и аденина. Воздействие УФ-облучения в присутствии фотосенсибилизатора приводит к образованию короткоживущих радикалов нуклеотидов, в том числе с радикальными центрами на тимине и аденине. Недавно было показано, что аминокислоты триптофан, тирозин и цистеин могут действовать как эффективные восстановители радикалов гуанина на микросекундной шкале, и этот механизм был назван «химическим путем» репарации ДНК. Аналогичные реакции, в принципе, могут идти с участием радикалов других оснований, но пока еще не были выявлены для радикалов тимина и аденина.

В данной работе было исследовано восстановление короткоживущих радикалов тимина и аденозина триптофаном, тирозином и их N-ацетил производными. Для генерации радикалов использовали импульсное лазерное облучение водного раствора, содержащего фотосенсибилизатор 3,3',4,4'-тетракарбоксибензофенон (ТСВР), тимин или аденозин и в качестве восстанавливающих агентов добавляли триптофан, N-ацетил триптофан, N-ацетил тирозин. На предварительном этапе было изучено фотоиндуцированное окисление тимина и аденозина триплетно-возбужденным ТСВР в отсутствие восстановителей, а образующиеся короткоживущие радикалы тимина и аденозина были охарактеризованы с помощью метода время-разрешенной химической поляризации ядер (ХПЯ). На основе количественного анализа кинетики ХПЯ, чувствительной к скоростям быстрых радикальных реакций, были определены константы скорости восстановления нейтрального и анион-радикалов тимина триптофаном и N-ацетил триптофаном, нейтрального радикала аденозина – триптофаном, N-ацетил триптофаном и N-ацетил тирозином. Проведено сравнение данных для аденозина и тимина с данными, полученными ранее для гуанозина, а также изучено влияние природы восстановителя.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 23-73-10103.

Молекулярно-динамический анализ функциональной роли аминокислотных остатков Val99, Phe124 и Ser125 ДНК-диоксигеназы человека ABH2

Чжао М.¹, Тюгашев Т.Е.², Кузнецов Н.А.^{1,2}

¹ Факультет естественных наук, Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия

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

Фермент ABH2 относится к суперсемейству Fe(II)/ α -кетоглутарат-зависимых диоксигеназ, катализирует прямое окисление алкильных заместителей в азотистых основаниях ДНК, является важным ферментом, отвечающим за репарацию метилированных повреждений в геноме. Диоксигеназы действуют на широкий спектр субстратов и имеют сложный каталитический механизм, однако особенности функциональной активности, в том числе молекулярный механизм, обеспечивающий субстратную специфичность этих ферментов, в настоящее время исследованы не полностью. В связи с этим в рамках данной работы проведен анализ функциональной роли ряда аминокислотных остатков (V99, F124, S125), расположенных в активном центре ABH2. Для этого было выполнено моделирование комплексов фермента дикого типа и его мутантных форм, содержащих замены V99A, F124A или S125A, с двумя видами ДНК-субстратов, несущих метилированные основания m¹A и m³C.

Замена V99A ослабляет сеть гидрофобных контактов с остатками V101 и V108 в петле L1 и F124 и L127 в петле L2, приводя к дестабилизации положения петель L1 и L2, а именно к переориентации или сдвигу ключевых аминокислотных остатков Y122, E175 и F102, необходимых для формирования каталитического комплекса. Кроме того, замена V99A индуцировала формирование неблагоприятной для осуществления катализа конформации α KG в каталитическом центре.

Замена F124A в кармане распознавания поврежденных нуклеотидов приводила к потере π - π стэкинга с метилированным основанием, что сопровождалось его сдвигом и также индуцировало смещение петель L1 и L2. При этом конформация α KG в активном центре и его координация с ионом Fe(II) также претерпевали перестройки, а остаток D173 образовал координационную связь с Fe(II) в бидентатном режиме.

Замена S125A приводила к потере прямого взаимодействия петли L2 с 5'-фосфатной группой поврежденного нуклеотида. В случае использования ДНК-субстрата, несущего m¹A в качестве повреждения, по данным молекулярного моделирования остатки R110 и R172 более прочно координировали сахарофосфатный остов ДНК, что компенсировало потерю связи, вызванную заменой S125A. В случае на m³C ДНК-субстрата такой компенсационный эффект отсутствовал, что свидетельствует о том, что узнавание разных повреждений имеет индивидуальные особенности.

Таким образом, проведенное молекулярно-динамическое (МД) моделирование трех мутантных форм V99A, F124A и S125A ABH2 человека позволило детализировать функциональную роль соответствующих остатков в активном центре и выявить влияние их замен на конформационную регуляцию механизма субстратной специфичности фермента.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-14-00018, с использованием ресурсов ИВЦ НГУ.

Точность действия ДНК полимераз на поврежденных и неповрежденных ДНК-матрицах при синтезе с вытеснением цепи

Чуприкова М. С.^{1,2}, Яковлев А.О.^{1,2}, Затева М.В.^{1,2}, Юдкина А. В.^{1,2}, Жарков Д. О.^{1,2}

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

ДНК-зависимые-ДНК-полимеразы представляют собой ферменты, которые играют основную роль в таких ключевых клеточных процессах, как репликация, репарация и транслезионный синтез. ДНК-полимеразы главным образом обеспечивают поддержание стабильности генома, поэтому они могут использоваться в качестве важной фармакологической мишени при лечении различных заболеваний, например, вирусных и бактериальных инфекций, нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Кроме того, ДНК-полимеразы играют важную роль в биотехнологии и биоаналитике.

Способность ДНК-полимераз безошибочно воспроизводить последовательность ДНК-матрицы характеризуется таким параметром, как «точность». Изучение механизмов, обеспечивающих точность ДНК-полимераз, представляет интерес не только для фундаментальной науки, но и имеет технологическое применение. Однако, имеющиеся в литературе количественные данные о точности ДНК-полимераз в подавляющем большинстве получены на простейших субстратах вида «праймер-матрица», что не позволяет оценить вклад процессов синтеза с вытеснением цепи, которые часто встречаются в живой клетке при репликации отстающей цепи, репарации и др. процессах.

Цель работы заключалась в исследовании точности включения одного нуклеотида с вытеснением цепи различными ДНК-полимеразами на неповрежденных (G или C) и поврежденных (U, 8-охоG и THF, как аналог АП-сайта) субстратах, содержащих вытесняемую цепь разной структуры — «праймер-матрица», «ник», «гэп», «ник-флэп» и «гэп-флэп». Нами была изучена точность для репрезентативных представителей ДНК-полимераз из 4-х наиболее распространенных структурных семейств: фрагмент Клёнова (KF) ДНК-полимеразы I *E. coli* (exo-) семейства A, ДНК-полимераза бактериофага RB69 семейства B, ДНК-полимераза β (POL β) человека семейства X и ДНК-полимераза κ (POL κ) человека семейства Y.

В рамках работы было показано, что точность ДНК-полимераз критически зависит от присутствия и структуры вытесняемой цепи и варьируется в зависимости от индивидуальных свойств непосредственно ДНК-полимеразы. Кроме того, количественные данные, полученные при прохождении неповрежденной ДНК полимеразой KF на субстратах типа «ник» и «ник-флэп», косвенно подтверждают механизм транслокации ДНК-полимераз. В связи с этим, говоря о точности ДНК-полимеразы при прохождении повреждения, необходимо измерять и учитывать параметры в присутствии вытесняемой цепи разной структуры.

Исследование поддержано грантом РНФ № 24-74-10040.

Создание и характеристика клонов клеток НЕК293А со сниженным содержанием субъединиц Ku-антигена

Ямских А.А.¹, Ильина Е.С.¹, Дырхеева Н.С.¹, Медведев С.П.², Жарков Т.Д.¹, Жуков С.А.¹, Купрюшкин М.С.¹, Закиян С.М.², Ходырева С.Н.¹, Лаврик О.И.¹

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

² *Федеральный Исследовательский Центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

Одним из приоритетных направлений повышения эффективности противоопухолевой терапии, основанной на применении ДНК-повреждающих агентов, является поиск путей подавления активности репарационных процессов, которые, удаляя повреждение, противодействуют терапевтическому воздействию. Двухцепочечные разрывы (ДЦР) ДНК – наиболее цитотоксический вид повреждения ДНК. Ключевым белком, инициирующим репарацию двухцепочечных разрывов путем негомологичного соединения концов ДНК (основной путь репарации ДЦР в клетках млекопитающих), является Ku-антиген, состоящий из двух субъединиц: Ku70 (69,9 кДа) и Ku80 (82,7 кДа). Введение в клетки коротких ДНК-дуплексов – миметиков ДЦР, эффективно связывающихся с Ku-антигеном, – может дезорганизовать репарацию ДНК и, тем самым, повысить чувствительность клеток к действию терапевтических генотоксических агентов.

Удобной моделью для изучения указанных воздействий являются клетки со сниженным количеством Ku-антигена. С использованием технологии CRISPR/Cas9 нами получены клеточные клоны на основе линии НЕК293А со сниженным содержанием субъединиц Ku70 или Ku80. Введение CRISPR/Cas9-индуцированных делеций в соответствующие гены показано анализом методом ПЦР. Вестерн-блот анализ выявил снижение содержания субъединиц Ku70 или Ku80 в отобранных клеточных клонах, а также сопутствующее снижение количества второй субъединицы-партнера.

Неустойчивость к действию нуклеаз и плохое проникновение в клетки ограничивают использование нативных ДНК-дуплексов в терапевтических целях. Для улучшения характеристик в состав потенциальных сенсibilизирующих ДНК вводили различные модификации – триазиламидофосфатную группу с двумя додецильными (ТД) остатками, фосфорилгуанидиновую группу (ФГ), сочетание ТД и ФГ групп или остаток холестерина. Введение таких липофильных заместителей, как нами было показано, обеспечивает проникновение ДНК в клетки в отсутствие трансфектантов. Анализ взаимодействия Ku-антигена с указанными ДНК, проведенный с применением их химически активных производных, содержащих 5'-дезоксирибозофосфатный остаток или фотоактивируемый аналог dCMP, продемонстрировал их эффективное связывание с Ku-антигеном. Это позволяет использовать такие ДНК для детекции целевых белков в экстрактах. Последующая аффинная модификация этими ДНК-зондами белков экстрактов, полученных из отобранных клонов и родительских клеток, продемонстрировала существенное снижение количества продуктов, соответствующих сшивкам Ku70 и Ku80 белков с ДНК-дуплексами.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ

Секция организована при финансовой поддержке гранта РФ
№ 19-74-30011, руководитель – академик РАН В.В. Власов

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Воздействие антисмысловыми олигонуклеотидами на малую РНК *Mycobacterium tuberculosis* модулирует иммунный ответ при инфекции

Скворцова Ю.В.¹, Салина Е.Г.², Быченко О.С.¹, Мартини Б.А.², Брылев В.А.¹,
Аралов А.В.¹, Ажикина Т.Л.¹

¹ ГНЦ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² ФГБУН Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук,
Москва, Россия

Многовековая ко-эволюция внутриклеточного патогена *Mycobacterium tuberculosis* и его хозяина позволила микобактерии выработать набор стратегий, позволяющих эффективно бороться с системами защиты макроорганизма. Среди них - малые некодирующие бактериальные РНК, которые могут не только адаптировать бактериальный транскриптом под меняющиеся условия, но также взаимодействовать с инфицированным организмом, вмешиваясь тем самым в процессы антибактериальной защиты. Ранее нами впервые показано, что малая РНК MTS1338 является фактором вирулентности *M.tuberculosis*, запуская молекулярные каскады для презентации антигенов, созревания фагосомы, синтеза провоспалительных цитокинов и интерферонов I типа. Кроме того, мы впервые обнаружили секрецию MTS1338 в цитоплазму инфицированных макрофагов [1].

Проведены эксперименты по воздействию антисмысловых олигонуклеотидов (ASO), нацеленных на различные одноцепочечные участки малой РНК MTS1338, на макрофаги мыши RAW 267.4, инфицированные микобактериями. Были тестированы два типа фосфоротиоатных олигонуклеотидов, различающихся способностью привлекать РНКазу H, модифицированные остатками LNA (locked nucleic acid), или содержащие нуклеозидные вставки на основе феноксазина, т.н. G-clamps [2]. Определение количества MTS1338 в цитоплазме инфицированных макрофагов после обработки ASO показало, что некоторые ASO статистически значимо увеличивали количество молекул малой РНК. Следствием этого являлось изменение экспрессии провоспалительных цитокинов, таких как TNF α , IL1 β , IL17. Полученные данные могут быть использованы в дальнейших разработках подходов к подавлению внутриклеточного роста *M.tuberculosis*.

1. Bychenko O.S., Khrulev A.A., Svetlova J.I., Tsvetkov V.B., Kamzееva P.N., Skvortsova Y.V., Tupertsev B.S., Ivanov I.A., et al. Red light-emitting short Mango-based system enables tracking a mycobacterial small noncoding RNA in infected macrophages. // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – V. 51 (6). – P 2586–2601.
2. Knizhnik E., Chumakov S., Svetlova J., Pavlova I., Khodarovich Y., Brylev V., Severov V., Alieva G., et al. Unwinding the SARS-CoV-2 Ribosomal Frameshifting Pseudoknot with LNA and G-Clamp-Modified Phosphorothioate Oligonucleotides Inhibits Viral Replication. // *Biomolecules* – 2023. – V.13. – P 1660.

Исследование поддержано грантом РНФ, проект 22-14-00235.

АНТИ-EGFR аптамеры для тераностики клеток культур глиобластом пациентов

Антипова О.М.^{1,2}, Моисеенко В.Л.^{1,2}, Иванов Б.М.¹, Дзариева Ф.М.³,
Самойленкова Н.С.², Савченко Е.А.², Пронин И.Н.², Павлова Г.В.^{2,3}, Копылов А.М.^{1,2}

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова

² НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко Минздрава России

³ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН
antipovachem@gmail.com

Глиобластома (ГБ) –агрессивная гетерогенная опухоль головного мозга человека. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) - основной опухолевый маркер ГБ. Аптамеры – олигонуклеотиды, высокоаффинно связывающие мишень, «химические антитела». Разработка аффинных агентов к EGFR– актуальная задача тераностики ГБ. Целью настоящей работы была оценка использования анти-EGFR аптамеров для детекции маркера и создания антипролиферативных агентов для клеток перевиваемых культур ГБ пациентов (КПКГБП).

Анти-EGFR аптамеры: 2'-F-замещенные по пиримидин-нуклеотидам (2'FY-) РНК - ME07, CL4, и ДНК - U2, U31, авторские Gol1 и GR20.

Методом интерферометрии биослоев показана аффинность аптамеров к рекомбинантному внеклеточному домену EGFR, для Gol1 и GR20 константа диссоциации Kd комплекса аптамер-белок ниже исходных U2, U31.

Проточной цитометрией показано взаимодействие анти-EGFR аптамеров с линейными клетками и КПКГБП: Sus, G01, 90, 107.

Оригинальная аптамерная нековалентная конструкция аптамера GR20 с интеркалированным доксорубицином (ДОКСом) эффективно и направленно доставляет ДОКС в EGFR+ клетки КПКГБП.

Работа выполнена при финансовой поддержке: гранта №75-15-2024-561 от 24.04.2024

1,3-Диаза-2-оксофеноксазин и его аналоги: синтез и примеры использования

Аралов А. В.¹, Козловская Л. И.², Гусева Е. А.^{3,4}, Завьялова Е. Г.⁴, Варижук А. М.⁵

¹ Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

² ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН, Москва, Россия

³ НИИ Физико-Химической Биологии имени А. Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

⁴ Химический факультет МГУ, Москва, Россия

⁵ ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю. М. Лопухина, Москва, Россия

Взаимодействия нуклеиновых кислот между собой и с клеточными белками в значительной степени основаны на образовании стабильных водородных связей и стэкинг-взаимодействиях нуклеиновых оснований. 1,3-Диаза-2-оксофеноксазин (tC^O), флуоресцентный миметик цитозина с расширенной ароматической системой, обеспечивает стабилизацию дуплексов за счет образования трех Н-связей с комплементарным гуанином и дополнительных стэкинг-взаимодействий с соседними нуклеиновыми основаниями. Аналоги tC^O , названные G-clamp и гуанидино G-clamp, содержащие 9-амино- или 9-гуанидино-этокси группу, соответственно, способны образовывать дополнительные Н-связи с O6/N7 атомами комплементарного гуанина. Данная способность определяет их уникальные стабилизирующие и дискриминирующие свойства. Идеальная имитация паттерна образования Н-связей цитозина, наличие чувствительных к микроокружению флуоресцентных свойств, а также присутствие большого количества положений для модификаций сделала феноксазиновый остов перспективным кандидатом для разработки терапевтических средств и молекулярных инструментов на основе нуклеиновых кислот и их компонентов.

1,3-диаза-2-оксофеноксазиновые модификации были опробованы в составе антисмысловых олигонуклеотидов, в качестве флуоресцентных зондов для детекции мисматчей и распознавания 8-оксо-dG, а также для ковалентной сшивки 8-нитро- и 8-тиогуанозина. Аналог G-clamp, содержащий фотопршиваемую арилдизазириновую группу, в составе микроРНК обеспечил обнаружение клеточных мРНК мишеней. Использование трифосфата tC^O позволило синтезировать полностью $C \rightarrow tC^O$ -модифицированную мРНК и осуществить пространственно-временной мониторинг ее поглощения, транспорта и колокализации в модели живых клеток с одновременным обнаружением ее трансляции в белок H2B:GFP.

В своих работах мы синтезировали ряд аналогов G-clamp, а именно G^{8AE} -clamp, *i*-clamp и гуанидино *i*-clamp, и продемонстрировали их перспективные стабилизирующие свойства в составе дуплексов и *i*-мотивов (*iM*), одной из форм неканонических вторичных структур нуклеиновых кислот. Разработанная нами tC^O_{Azo} модификация обеспечила создание первого цитоплазматического рН сенсора на основе мономолекулярного *iM*. Зависящие от микроокружения флуоресцентные свойства феноксазина позволили разработать достоверную систему скрининга низкомолекулярных *iM*-стабилизаторов и выявить сайт-связывания уникального *iM*-содержащего аптамера к гематглютину. Наконец, впервые были продемонстрированы противовирусные и активирующие аутофагию свойства нуклеозидных производных, содержащих 1,3-диаза-2-оксофеноксазиновый остов.

Разветвленные конъюгаты аптамера GR20 к рецептору EGFR

Брылёв В.А.^{1,2}, Сапожникова К.А.¹, Гуляк Е.Л.¹, Головин А.В.³, Копылов А.М.³, Павлова Г.В.², Пронин И.Н.², Коршун В.А.^{1,2}

¹ ФГБУН Государственный научный центр Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

² ФГАУ «НМИЦ Нейрохирургии им. Академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

Рецептор эпидермального фактора роста EGFR, относящийся к семейству ErbB тирозинкиназ, является перспективной мишенью в терапии различных онкологических заболеваний [1]. Известны несколько мутантных форм, отличающихся от изоформы дикого типа уровнем экспрессии, а также функциями в сигнальных путях раковых клеток. Ранее получен аптамер GR20, обладающий высокой аффинностью к рецептору EGFRvIII – часто встречающейся изоформе в клетках глиом и глиобластом человека [2].

Нами предложен дизайн и выполнен синтез ряда разветвленных ковалентных конъюгатов аптамера GR20 с противоопухолевыми агентами доксорубицином и моно-метилауристатином Е на основе ранее описанных подходов [3] с использованием разветвленных полиазидов и методов клик-химии [4]. Особенностью полученных конъюгатов является наличие ферментативно-расщепляемого линкера. Предполагается, что в случае связывания конъюгата с мишенью EGFRvIII и его интернализации, происходит ферментативное расщепление ди- или трипептидного линкера под действием катепсина В с высвобождением полезной нагрузки.

На данный момент изучается способность интернализации таких конъюгатов, а также их противоопухолевая активность.

1. D.A. Sabbah, et al. Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors. CTMC 2020, 20 (10), 815–834.
2. E.G. Zavyalova, et al. Pyrene-Modified DNA Aptamers with High Affinity to Wild-Type EGFR and EGFRvIII. Nucleic Acid Therapeutics 2020, 30 (3), 175–187.
3. K.A. Sapozhnikova, et al. Aminoxy Click Modification of a Periodate-Oxidized Immunoglobulin G: A General Approach to Antibody–Drug Conjugates with Dye-Mediated Expedient Stoichiometry Control. IJMS 2023, 24 (6), 5134.
4. A.I. Ponomarenko, et al. Tetrahedral DNA Conjugates from Pentaerythritol-Based Polyazides. Tetrahedron 2016, 72 (19), 2386–2391.

Исследование было выполнено при поддержке гранта Минобрнауки № 75-15-2024-561.

Авторы выражают благодарность Назаровой Е.В. за помощь в синтезе и очистке конъюгатов аптамеров.

Аптамеры к белкам, ассоциированным с воспалением

Воробьева М.А.

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

ДНК- и РНК-аптамеры связывают заданные молекулы-мишени с высокой аффинностью и специфичностью. Они являются наиболее близкими функциональными аналогами белковых антител, обладая при этом набором уникальных преимуществ, обусловленных химической природой нуклеиновых кислот. В первую очередь это возможность *in vitro* селекции, наличие точной информации о нуклеотидной последовательности и структуре аптамеров, автоматический химический синтез аптамеров и высокая воспроизводимость их свойств от партии к партии, возможность транспортировки и хранения в широком диапазоне условий.

Перспективной областью биомедицинского применения аптамеров является диагностика и терапия патологий, ассоциированных с острым и хроническим воспалением, в том числе иммуновоспалительных ревматических заболеваний. Создание новых тест-систем на основе аптамеров актуально для ранней диагностики и длительного мониторинга ключевых биомаркеров этих патологий. С другой стороны, аптамеры, способные ингибировать функциональную активность ассоциированных с воспалением белков, представляют собой основу для таргетных терапевтических средств.

В докладе будет представлено современное состояние проблемы создания и применения аптамеров к белкам-участникам воспалительных каскадов, а также полученные нами результаты по созданию и применению олигонуклеотидных аптамеров, направленных на биомаркеры воспаления и костного метаболизма.

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

Аптамеры, связывающие интерлейкин-17А, как потенциальные биоузнающие элементы систем детекции и терапии иммуновоспалительных ревматических заболеваний

Давыдова А.С.¹, Королев М.А.^{1,2}, 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 ИЦИГ СО РАН, Новосибирск, Россия

Интерлейкин-17А (ИЛ-17А) является важным участником патогенеза различных ассоциированных с воспалением заболеваний, среди которых важное место занимают иммуновоспалительные ревматические заболевания. Разработка новых систем детекции ИЛ-17А и его направленного ингибирования является актуальной задачей для совершенствования диагностики и терапии данных патологий. В настоящее время для этих целей используются преимущественно специфичные антитела, что накладывает ограничения на условия транспортировки, хранения и использования лекарственных препаратов и тест-систем. Альтернативой белковым антителам могут стать аптамеры – короткие синтетические ДНК или РНК, специфично связывающие заданные мишени. Выгодными преимуществами аптамеров являются стабильность в широком диапазоне условий, возможность воспроизводимого химического синтеза и введения различных модификаций. В данной работе исследован диагностический и терапевтический потенциал 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих ИЛ-17А. Оценена аффинность индивидуальных аптамеров и химерных конструкций, объединяющих в одной молекуле нуклеотидные последовательности аптамера и квадруплекс-формирующего пероксидазоподобного ДНКзима. Показано, что включение аптамера в состав химерной молекулы не оказывает значительного влияния на его сродство к ИЛ-17А. При этом ДНКзим сохраняет способность связывать гемин и катализировать окисление хромогенного субстрата в присутствии перекиси водорода. Индивидуальные аптамеры и химерные конструкции были использованы как компоненты микропланшетной колориметрической системы детекции ИЛ-17А. В этой системе химера аптамер-ДНКзим одновременно выступает и в качестве узнающего элемента, специфично связывающего ИЛ-17А, и в качестве репортера, генерирующей аналитический сигнал.

Терапевтический потенциал пэгилированных аптамеров к ИЛ-17А был исследован *in vivo* на модели протеогликан-индуцированного спондилоартрита у мышей BALB/C. Было показано, что трехкратное внутривенное введение аптамера приводит к уменьшению проявлений заболевания по сравнению с контрольной группой животных, не получавших лечение.

Таким образом, химерные конструкции на основе ИЛ-17А-специфичных аптамеров потенциально могут быть использованы в качестве комбинированных агентов для колориметрических систем детекции данного биомаркера. Индивидуальные аптамеры в перспективе могут рассматриваться как терапевтические препараты для лечения иммуновоспалительных ревматических заболеваний.

Исследование было поддержано совместным грантом РНФ и Правительства Новосибирской области № 22-15-20050 и грантом РНФ № 22-25-00219.

Олигонуклеотиды, содержащие фосфорилгуанидиновые модификации, как перспективные инструменты диагностики нуклеиновых кислот

Дмитриенко Е.В., Булгакова А.Е., Кабилов М.Р., Ломзов А.А., Степанов Г.А.,
Купрюшкин М.С., Пышный Д.В.

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

Нуклеиновые кислоты, их аналоги и производные являются молекулярными инструментами для научных молекулярно-биологических исследований, а также используются для решения практических задач биомедицины, биотехнологии и молекулярной диагностики. Введение химических модификаций в состав олигонуклеотидов позволяет направленно изменять их структуру, свойства, взаимодействие с биомолекулами. Синтетические аналоги нуклеиновых кислот часто обладают улучшенными физико-химическими и молекулярно-биологическими свойствами. Применение модифицированных олигонуклеотидов, конструирование на их основе диагностических систем, а также использование их в различных гетерофазных форматах для эффективного выделения и анализа позволяет решить проблемы современной диагностики нуклеиновых кислот.

В 2014 г. в ИХБФМ СО РАН были разработаны новые электронейтральные фосфорилгуанидиновые производные олигонуклеотидов. Начиная с этого момента непрерывно исследуют их свойства и возможность практического применения для решения широкого спектра фундаментальных и практических задач.

В ходе работы коллективом авторов проведено скрининговое исследование влияния положения и количества фосфорилгуанидиновых модификаций в составе олигонуклеотидов на их физико-химические свойства и эффективность процессирования ферментами, а также их способность выступать в качестве зондов для молекулярной диагностики. Получен набор данных, в еще большей степени раскрывающих потенциал использования фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов для разработки современных систем анализа нуклеиновых кислот, и позволяющих разрабатывать алгоритмы направленного конструирования высокоспецифичных зондов и праймеров для решения наиболее сложных прикладных задач в области молекулярной диагностики нуклеиновых кислот.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (№ 22-24-00996) и государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (№ 121031300042-1).

Аптамерные тест-системы на основе спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния в сочетании с мембранными технологиями

Завьялова Е. Г.¹, Мушенков В.А.¹, Кукушкин В.И.², Нечаев А.Н.³

¹ *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

² *Институт физики твердого тела РАН, Черноголовка, Россия*

³ *Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия*

Аптамеры – структурированные олигонуклеотиды, способные к специфическому связыванию аналитов. Константы диссоциации комплексов аптамер-белок находятся в диапазоне 10^{12} – 10^{10} М, что сопоставимо с аффинностью антител. В отличие от других узнающих элементов, аптамер можно разработать к аналиту любого класса, а сами аптамеры получают автоматическим химическим синтезом, при этом есть возможность сайт-специфического введения модификаций. В настоящее время аптасенсоры – биосенсоры на основе аптамеров – активно разрабатываются с привлечением самых разных физических принципов детекции: от спектроскопии до электрохимических устройств. Одно из перспективных сочетаний – аптамеры и спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), где аптамеры определяют специфичность определения аналита, а ГКР позволяет достичь высокой чувствительности сенсора. Дополнение ГКР-сенсора мембранными технологиями позволяет решать задачи концентрирования и очистки образцов перед получением ГКР-спектра.

Последняя пандемия актуализировала разработку экспресс-тест-систем для специфического высокочувствительного определения патогенов. Ранее нами была предложена тест-система на основе мембраны с ГКР-активной поверхностью, функционализированная ДНК-аптамерами к вирусу гриппа А. Предел обнаружения достигал 10 вирусных частиц в пробе. Мембранная фильтрация также совместима с тест-системой на основе коллоидных наночастиц серебра, позволяя достигать предел обнаружения $2 \cdot 10^2$ вирусных частиц гриппа А в пробе. Достигаемые пределы обнаружения перечисленных тест-систем сопоставимы с полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией, золотым стандартом диагностики респираторных вирусов.

Вместе с тем, помимо определения вирусов не менее важно быстрое определение бактерий, включая устойчивость к антибиотикам, что определяет адекватный подбор терапии. Для визуализации бактерий был предложен МТТ-тест, в ходе которого живые клетки продуцируют формазан, определяемый методом резонансного гигантского комбинационного рассеяния. Образцы бактериальных культур после обработки МТТ-реагентом фильтруются через мембраны с напыленными наночастицами серебра, при этом на мембранах задерживаются клетки и свободно плавающие кристаллы формазана. За счет эффекта резонансного ГКР минимально определяемая концентрация бактерий составляла $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл. Усиление сигнала оказалось достаточно высоким для измерения спектра формазана от отдельных клеток при помощи рамановского микроскопа, таким образом чувствительность метода была повышена вплоть до анализа единичных клеток. При действии антибиотика интенсивность полос формазана единичных клеток снижается, позволяя оценить устойчивость образца к антибиотику.

Полученные результаты позволяют заключить о перспективах создания тест-систем, функционализированных ДНК-аптамерами, для специфического определения широкой панели патогенов без предварительной культивации и очистки.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-65-00015, <https://rscf.ru/project/24-65-00015/>.

Поиск эффективного протокола синтеза γ -(S)-карбоксиэтил ПНК

Прохоров И.А.¹, Лузянин Т. А.¹, Есенина А. А.¹, Кириллова Ю. Г.¹

¹ МИРЭА – Российский технологический университет, институт тонких химических технологий им. М.В.Ломоносова, кафедра биотехнологии и промышленной фармации, Москва, Россия

Пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК) - аналоги нуклеиновых кислот, сохраняющие способность к гибридизации с РНК/ДНК-мишенями [1]. К настоящему времени аминоэтилглициновых (аег) ПНК и их производные находят применение в биомедицинских исследованиях. Среди различных модификаций аег-ПНК перспективными признаны ациклические γ -производные [1]. В нашей работе γ -ПНК-мономеры несли отрицательный заряд [2], что функционально приближает ПНК к олигонуклеотидам природного строения.

Ранее мы использовали Boc/Cbz/Bn-протокол твёрдофазного синтеза (ТФС) пептидно-нуклеиновых кислот на основе L-Glu [2]. ТФС проводили на MBHA-смоле, используя глицин или β -аланин в качестве линкера, при этом использовались жёсткие сильно-кислые условия отщепления и деблокирования конечного олигомера, выход олигомеров не превышал 12%. Тем не менее, были получены олигомеры γ -карбоксиэтил(се)-ПНК, и было показано, что такая модификация перспективна для биомедицинских применений.

Задача настоящего исследования состояла в поиске эффективного протокола синтеза γ -(се)-ПНК с учетом особенностей получения мономеров и рационального выбора защитных групп для ТФС, без использования кислоты на стадии отщепления олигомеров.

Нами были предприняты попытки создания мономеров для Boc/Cbz/^tHex-, Boc/Alloc/All- и Fmoc/Boc/^tBu-протоколов. Однако ни в одном из них не удалось решить две основные проблемы синтеза: циклизация псевдодипептидов на стадии тиолиза в синтезе мономеров и деградацию олигомеров при отщеплении от носителя в ТФС. Только при замене Bn-группы в боковом радикале на циклогексильную (^tHex) удалось добиться технологичности стадии тиолиза. Замена же защитной Cbz- на Alloc-группу в нуклеиновых основаниях позволяет отказаться от кислых условий при деблоке. В ТФС был использован глицилгликолатный линкер, содержащий в структуре сложный эфир. Это позволило проводить отщепление олигомеров в слабых основных условиях с одновременным гидролизом ^tHex-групп в боковых радикалах. Важно, что эти условия не приводят ни к нарушению химической структуры, ни к потере оптической чистоты и подобны условиям финального этапа синтеза мономеров ПНК.

Таким образом, разработан Boc/Alloc/^tHex-протокол, выход мономеров удалось повысить в 2 раза по сравнению с Boc/Cbz/Bn-протоколом, а выход олигомеров в 5-7 раз.

1. Brodyagin N., Katkevics M., Kotikam V., Ryan C. A., Rozners E. *Chemical approaches to discover the full potential of peptide nucleic acids in biomedical applications* // Beilstein J Org Chem. - 2021. - V. 17 (1). - P. 1641-1688.
2. Kirillova Y, Boyarskaya N, Dezhnevov A, др. Всего 10 человек. *Polyanionic Carboxyethyl Peptide Nucleic Acids (ce-PNAs): Synthesis and DNA Binding*. PLoS One. – 2015.- V. 10. -e0140468.

Аналоги олигонуклеотидов расплетают псевдоузел в геноме коронавируса

Книжник Е.К.^{1,2}, Чумаков С.П.³, Павлова Ю.И.^{1,2}, Светлова Ю.И.¹, Аралов А.В.³,
Варижук А.М.^{1,2}

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика
Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

³ Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Псевдоузлы – консервативные структуры геномной РНК ряда вирусов. В простейшем случае представляют собой комбинацию двух взаимопересекающихся шпильчатых фрагментов, стебли которых неравноценны по термодинамической устойчивости. В геноме SARS-CoV-2 подобная структура расположена вблизи сайта проскальзывания рибосомы и обеспечивает программируемый –1 сдвиг рамки считывания [1]. Поскольку расплетение псевдоузла должно остановить репликацию вируса [2], актуальной задачей является дизайн эффективных расплетающих агентов.

В качестве таких агентов были предложены аналоги олигодезоксирибонуклеотидов (ОДН), комплементарные одной из цепей псевдоузлового стебля и вытесняющие другую цепь ввиду более прочного связывания с мишенью за счет модификаций нуклеиновых оснований и остова ОДН, а именно введения остатков LNA/G-clamp и фосфоротиоатных межнуклеотидных связей [3]. Новизна работы также обусловлена рациональным выбором стерически доступной мишени ОДН – фрагмента наименее устойчивого стебля. Это слабое звено в структуре псевдоузла определяли на основании опубликованных результатов *in vitro* экспериментов с молекулярными пинцетами.

Используя электрофоретические и оптические методы, мы продемонстрировали расплетение псевдоузла аналогами ОДН *in tube*. С помощью двойного люциферазного теста было доказано ингибирование сдвига рамки считывания в присутствии ОДН в клетках линии HEK-293T. По результатам оценки цитопатического эффекта было показано ингибирование репликации SARS-CoV-2 аналогами ОДН в субтоксической концентрации. В дальнейших исследованиях предполагается возможность рассмотрения полученных соединений в качестве основы терапевтических препаратов против коронавирусной инфекции.

1. Bhatt, P.R. et al. Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome. *Science* 2021, doi: 10.1126/science.abf3546
2. Kelly, J.A. et al. Programmed –1 Ribosomal Frameshifting in coronaviruses: A therapeutic target. *Virology* 2021, doi: 10.1016/j.virol.2020.12.010
3. Knizhnik, E.; Chumakov, S. et al. Unwinding the SARS-CoV-2 Ribosomal Frameshifting Pseudoknot with LNA and G-Clamp-Modified Phosphorothioate Oligonucleotides Inhibits Viral Replication. *Biomolecules* 2023, 13, 1660. doi: 10.3390/biom13111660

Применение ДНК-аптамеров для создания электрохимических биосенсоров

Комарова Н. В.¹, Кузнецов А. Е.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт нанотехнологий микроэлектроники Российской академии наук,
Москва, Россия

Аптамеры являются перспективным инструментом биоаналитической химии. Благодаря простоте и низкой стоимости синтеза, возможности химической модификации, способности к регенерации и высокой воспроизводимости физико-химических свойств, аптамеры могут выступать в качестве альтернативы антителам при создании аффинных биосенсоров различного рода. Электрохимические биосенсоры на основе аптамеров, в свою очередь, представляют собой удобное решение для разработки миниатюрных портативных анализаторов для широкого спектра применений, включающего медицинскую диагностику, мониторинг окружающей среды и контроль качества пищевых продуктов.

Химически чувствительные полевые транзисторы имеют большой потенциал применения в качестве чувствительного элемента при создании электрохимических аптасенсоров благодаря высокой чувствительности, миниатюрным размерам, невысокому энергопотреблению, возможности интеграции со схемами обработки сигнала в едином цикле производства и низкой себестоимости при массовом выпуске. В основе чувствительности аффинных биосенсоров на основе полевых транзисторов лежит их способность детектировать изменение заряда на поверхности сенсора, в результате чего происходит модуляция тока в канале транзистора. При модификации чувствительной поверхности сенсора аптамерами отклик устройства становится избирательным по отношению к желаемой мишени.

Целью наших исследований является разработка биосенсоров на основе химически чувствительных полевых транзисторов в комбинации с ДНК-аптамерами. Основными задачами являются выделение новых ДНК-аптамеров, исследование подходов для эффективной точечной модификации поверхности транзисторов олигонуклеотидами, непосредственное создание аптасенсоров и изучение их характеристик.

Методом Capture-SELEX получены ДНК-аптамеры к низкомолекулярным соединениями, имеющим значимость для пищевой промышленности (ванилина, фуранеола) и медицинских исследований (глутаминовая кислота, ацетилхолин).

Систематическое сравнение различных подходов к ковалентной иммобилизации ДНК-олигонуклеотидов на чувствительной поверхности транзисторов показало, что использование реакций формирования дисульфидной связи и азид-алкинового циклоприсоединения являются наиболее эффективными для создания рецепторного слоя аптасенсоров.

С использованием полученных результатов разработаны аптасенсоры на основе химически чувствительных транзисторов для определения ванилина, фуранеола, тромбина и тропонина I.

Разработка аптасенсора для экспресс-диагностики инфаркта миокарда

Красицкая В. В.¹, Морозова Е. П.¹, Лукьяненко А. В.², Шанидзе Л. В.², Франк Л. А.¹

¹ Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

² Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН,
Красноярск, Россия

Острый инфаркт миокарда (ОИМ), как наиболее тяжелая клиническая форма ишемической болезни сердца, является одной из основных причин высокой смертности среди населения планеты. Диагностика ОИМ на ранней стадии обеспечивает успех своевременной терапии и сохранению жизни пациента, поэтому создание новых эффективных экспресс-методов такой диагностики имеет высокую актуальность и значимость. Аптасенсоры, в которых элементом биологического распознавания являются РНК/ДНК аптамеры, представляют собой перспективные инструменты быстрой внелабораторной (Point-of-Care) диагностики благодаря таким свойствам аптамеров как высокая аффинность, специфичность, стабильность, возможность химического синтеза, а также модификации различными функциональными группами и легкого рефолдинга структуры. В лаборатории биологических и экологических технологий ИБФ СО РАН были получены высокоаффинные и специфичные ДНК аптамеры к самому кардиоспецифичному маркеру ОИМ - тропонину I (cTnI) и наиболее раннему кардиомаркеру - белку, связывающему жирные кислоты (hFABP). В работе представлены результаты по разработке различных вариантов аптасенсоров для выявления данных кардиомаркеров: cTnI на основе латерального проточного анализа и hFABP на основе нанопроволочного полевого транзистора.

Для визуальной детекции результатов латерального анализа cTnI использовали наночастицы золота (ЗНЧ). В представленной работе были получены ЗНЧ разного размера, исследованы различные способы иммобилизации аптамеров на поверхность ЗНЧ и на нитроцеллюлозную мембрану, оптимизирован дизайн и условия анализа для выявления cTnI.

Перспективным методом детекции является аптасенсор на основе полевого транзистора, который позволяет проводить анализ в режиме реального времени без использования меток. Поверхность кремниевой нанопроволки (SiNW) полевого транзистора модифицировали органосилоном APTES, иммобилизацию аптамера FABP_{Ap1c-t38} проводили химически с помощью монобифункционального сшивающего реагента диметилсуберимидата. Исследованы вольт-амперные характеристики между контактными площадками истока и стока на каждом этапе функционализации поверхности SiNW различной толщины, а также при добавлении разной концентрации hFABP. Полученные результаты открывают перспективы дальнейших исследований по оптимизации условий конструирования таких диагностических тест-систем для повышения их эффективности и чувствительности.

Исследование выполнено в рамках ГЗ Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FWES-2022-0002).

Синтетические подходы к получению конъюгатов функциональных нуклеиновых кислот с дополнительными лигандами

Мещанинова М.И.¹

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

Функциональные нуклеиновые кислоты (ФНК – малые интерферирующие РНК, антисмысловые олигонуклеотиды, каталитические НК, аптамеры, и т.д.) и конструкции на их основе в настоящее время представляют огромный интерес как высокоселективные инструменты молекулярной биологии и перспективные средства для диагностики и терапии широкого круга заболеваний.

Для внутриклеточной доставки ФНК, их использования для имиджинга, или придания им способности воздействовать на нуклеотидный или белковый материал клетки в настоящее время необходимо конъюгировать ФНК с лигандами различного типа – красителями для детекции НК, РНК-расщепляющими агентами, молекулами доставщиками (пептиды, липофильные соединения, рецептор-нацеленные лиганды), группировками для комплементарно-адресованной модификации НК и т.д.

Нами разработаны несколько методов синтеза как в растворе, так и на твердом носителе, позволяющих получать ковалентные конъюгаты олигонуклеотидов с гидрофобными группами, витаминами, пептидами, флуорофорами, различными малыми молекулами. Использование стимул-чувствительных связей позволяет получать конъюгаты, способные к отщеплению лиганда в определенный момент времени или в нужном клеточном компартменте.

Принципиальные возможности разработанных подходов были продемонстрированы на примере синтеза конъюгатов антисенс-олигонуклеотидов, siРНК, miРНК, митохондриальных РНК, а также компонентов CRISPR/Cas систем.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-14-00294.

Сравнение взаимодействия анти-CD133 2'F-Y-РНК- и ДНК-аптамеров с клетками глиобластомы человека

Моисеенко В. Л.¹, Антипова О. М.¹, Павлова С. А.², Фаб Л.В.², Павлова Г. В.^{2,3},
Копылов А.М.^{1,3}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

³ НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко Минздрава России, Москва, Россия

Глиобластома (ГБ) – одна из наиболее агрессивных опухолей головного мозга. Устойчивость к стандартным терапевтическим подходам и рецидивы связывают с наличием стволовых клеток ГБ. Белок CD133 – потенциальный маркер одного из ранних этапов дифференцировки клеток. Аптамеры – «химические антитела», специфично связывающиеся с молекулами-мишенями за счёт уникальной трёхмерной структуры. Целью работы было сравнение взаимодействия отобранных к CD133-экспрессирующим клеткам известных ДНК- и 2'F-Y-РНК-аптамеров с клетками перевиваемых культур ГБ пациентов (КПКГБП) [1,2].

Методом проточной цитофлуориметрии на CD133-экспрессирующих клетках для ДНК-аптамеров показана корреляция между средней интенсивностью флуоресценции MFI и количеством мРНК CD133, а также возможность выявления популяционной гетерогенности КПКГБП. Для 2'F-Y-РНК-аптамера и неаптамерного 2'F-Y-РНК-олигонуклеотида на стандартных линиях и КПКГБП зарегистрированы значительные сдвиги сигналов MFI, возможно, обусловленные повышенной гидрофобностью аптамеров из-за связей С-Ф и CD133-независимым взаимодействием. Определены параметры полунасыщения для комплексов аптамер-клетка для ДНК- и 2'F-Y-РНК-аптамеров на клетках стандартной CD133-экспрессирующей линии: 180 ± 12 нМ и 120 ± 27 нМ, соответственно.

Флуоресцентной микроскопией показано интенсивное окрашивание КПКГБП 2'F-Y-РНК-аптамером независимо от уровня мРНК CD133, что требует применения правил специфичности. Как и в случае проточной цитометрии, результаты микроскопии CD133-экспрессирующих клеток с флуоресцентными ДНК-аптамерами из разных селекций коррелируют с количеством мРНК CD133

По результатам сравнительного анализа можно выбирать аптамеры для аптадиагностики ГБ.

1. Shigdar S, Qiao L, Zhou SF et al., RNA aptamers targeting cancer stem cell marker CD133 // *Cancer Lett.* 2013. Vol. 330(1). P. 84-95.
2. Li W, Wang Z, Gao T, et al., Selection of CD133-targeted DNA aptamers for the efficient and specific therapy of colorectal cancer // *J. Mater. Chem. B.* 2022. Vol. 10(12). P. 2057-2066
3. Моисеенко В.Л., Антипова О.М., Павлова С.А. и др. Возможна ли детекция поверхностного антигена CD133 на перевиваемых культурах клеток глиобластомы пациентов с помощью флуоресцентных аптамеров? // Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко. 2024. Т. 88. № 1. С. 56-62.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-1343 от 4 октября 2021 г.).

Регуляция активности систем CRISPR/Cas9 на уровне направляющих РНК

Новопашина Д. С.^{1,2}, Горленко Е. С.^{1,2}, Должикова О. А.^{1,2}, Саковина Л.В.^{1,2},
Мещанинова М.И.¹

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Системы геномного редактирования, в частности система CRISPR/Cas9, являются универсальным инструментом для сиквенс-специфичного распознавания ДНК с целью проведения направленных генетических манипуляций. Разработка подходов к регуляции этой системы открывает возможности повышения специфичности редактирования. Одним из таких подходов к регуляции является использование модифицированных направляющих РНК в составе CRISPR/Cas9.

Целью данной работы является создание регулируемых систем CRISPR/Cas9 с использованием модифицированных направляющих РНК.

Нами было выбрано два варианта регуляции системы: облучение светом определенной длины волны и аллостерическая регуляция. Был проведен дизайн и синтез фоточувствительных направляющих РНК трех типов. В первом варианте направляющие РНК содержали фоторасщепляемые линкеры, позволяющие разрушить РНК путем облучения и, таким образом, отключить систему редактирования в определенный момент времени [1]. Во втором варианте для адресации системы использовали циклические РНК, содержащие фоторасщепляемый линкер. Циклическая РНК не активна вплоть до облучения, а в результате облучения происходит ее линеаризация и активация системы. Третий вариант направляющих РНК содержал в своем составе линкеры на основе азобензола, изменяющего свою конформацию при облучении. Облучение в УФ-диапазоне приводит к переходу азобензола в цис-изомер, а облучение в видимом диапазоне приводит к транс-изомеру. Такой вариант модификации РНК позволяет обратимо изменять ее пространственную структуру и сродство РНК к ДНК-мишени, а также к белку Cas9, и за счет этого активировать или инактивировать систему геномного редактирования. Кроме того, нами были использованы фотомодифицированные дополнительные олигонуклеотиды, в том числе иммобилизованные на углеродных наночастицах [2]. Для создания систем с аллостерической регуляцией были созданы направляющие РНК с внедренным в их структуру аптамером к теофиллину.

Таким образом, нами предложены варианты регулируемых систем CRISPR/Cas9, позволяющих включать, отключать или переключать их активность путем облучения или изменения концентрации определенных молекул в среде.

1. Новопашина Д.С., Хабардина Е. А., Мещанинова М.И., Вохтанцев И.П., Жарков Д.О., Веняминова А.Г. Патент 2765159 РФ, 2022.
2. Semikolenova O., Sakovina L., Akhmetova E., Kim D., Vokhtantsev I., Golyshev V., Vorobyeva M., Novopashin S., Novopashina D. Photoactivatable nanoCRISPR/Cas9 System Based on crRNA Reversibly Immobilized on Carbon Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* - 2021.- V.22. - P.10919.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 22-14-00294.

Платформа поиска и разработки тераностических аптамерных лекарственных препаратов (ПОРТАЛ) для диагностики и терапии глиом человека

Павлова Г.В.^{1,2*}, Колесникова В.А.¹, Павлова С.А.¹, Голанов А.В.², Пронин И.Н.²,
Коршун В.А.³, Брылев В.А.³, Головин А.В.⁴, Усачев Д.Ю.², Копылов А.М.⁴

¹ ИВНД и НФ РАН, Москва, Россия

² ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко Минздрава России,
Москва, Россия

³ ИБХ РАН, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
lkorochkin@mail.ru

Злокачественные образования считаются одной из самых серьезных проблем человечества. При этом часть опухолевых разрастаний все же поддается терапии, но есть злокачественные образования, в успешной терапии которых человечество пока не продвинулось. Одно из таких заболеваний – глиома. Классификация глиомы обычно разделяет их, согласно их злокачественности, на четыре степени. Одна из самых агрессивных и злокачественных форм – глиома IV степени, которая получила также специализированное название – глиобластома. Средняя продолжительность жизни пациентов с таким диагнозом – около 12-15 месяцев. При этом все подходы в терапии глиобластомы не увеличивают значительно этот интервал и не влияют на продолжительность жизни пациентов. Это частично обусловлено тем, что глиобластома обладает высокой гетерогенностью, и многие подходы к терапии не могут охватить все типы опухолевых клеток глиобластомы. Терапевтическое воздействие провоцирует гибель одних типов опухолевых клеток и выживание других. Выжившие клетки глиомы дают начало новой популяции и приводят к рецидиву. На данный момент стандартным подходом к терапии глиобластомы считается хирургическое удаление опухоли с последующей химиотерапией и лучевой терапией. При этом развитие лучевой терапии первоначально давало многообещающие результаты, так как ионизирующее излучение вызывает гибель опухолевых клеток. Однако наличие рецидивов после лучевой терапии заставляет обращать внимание на те опухолевые клетки, которые обладают радиорезистентностью (устойчивостью к лучевой терапии). В связи с тем, что все варианты терапии не позволяют достигнуть значительного увеличения продолжительности жизни пациентов, появляется необходимость поиска новых подходов. Мы предложили создать платформу аптатераностики, на базе которой можно разрабатывать и новый класс препаратов с использованием аптамеров против роста опухоли, диагностировать глиомы мозга по генетическим маркерам на основе специфических аптамеров, усовершенствовать ПЭТ-диагностику с помощью использования радиоактивно-меченных аптамеров, узнающих опухолевые маркеры, и использовать аптамеры, как молекулы носители для противоопухолевых препаратов для повышения таргетной доставки к злокачественному образованию. На базе данной платформы, которую мы назвали ПОРТАЛ (Поиск и Разработка Тераностических Аптамерных Лекарственных препаратов) предложена новая концепция лечения глиом с использованием аптамеров и малых молекул – «дифференцировочная терапия». В противоположность лекарственным методам, основанным на цитотоксическом воздействии, предложенный подход заключается в стимуляции апоптоза опухолевых клеток или их

дифференцировки в нейральном направлении, что приводит к остановке роста опухоли и уменьшению ее объема. Комбинация факторов дифференцировочной терапии состоит из аптамера-останавливающего деление опухолевых клеток и молекул-нейроиндукторов, управляющих нейрональной дифференцировочной незрелых клеток глиомы. Разработаны конъюгаты с использованием аптамеров, специфичных к мембранным опухолевым маркерам глиомы, для накопления радиофармпрепаратов в опухоли при визуализации с использованием ПЭТ. Подобная технология дает возможность визуализировать зоны повышенной агрессивности опухоли, а также края злокачественного образования. Получены G-квадруплексные аптамеры и их производные для повышения радиосенсибилизации клеток глиомы при лучевой терапии. Данный подход позволяет спровоцировать повышенную гибель опухолевых клеток, обладающих устойчивостью к облучению. При этом, обнаруженная комбинация аптамеров, снижает миграционные свойства опухолевых клеток, снижая вероятность рецидивов. И разработаны модифицирующие конъюгаты, содержащие катепсиновый линкер и полезную нагрузку в виде противоопухолевого соединения. Конъюгат, способен доставить терапевтическую молекулу в опухолевую клетку глиомы и расщепиться в ней с высвобождением лекарственного препарата.

Созданные аптамеры могут стать основой нового класса лекарственных средств, которые позволят увеличить продолжительность жизни пациентов с глиомами мозга, снизить их рецидивирование, что определяет высокий потенциал ПОРТАЛа и его социальную значимость.

Работа выполнена при финансовой поддержке: гранта №75-15-2024-561 от 24.04.2024

МикроРНК-направленные искусственные рибонуклеазы: новый класс анти-микроРНК терапевтических препаратов

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

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

² Университет Манчестера, Манчестер, Великобритания

В настоящее время ведутся интенсивные исследования в области разработки и совершенствования химически модифицированных олигонуклеотидов и олигонуклеотидных конъюгатов. Особый интерес привлекает создание сиквенса-специфичных искусственных рибонуклеаз (иРНКаз), представляющих собой конъюгаты олигонуклеотидов, в которых прикрепленная химическая группа проявляет нуклеазную активность и запускает каталитическое расщепление целевой РНК. Искусственные ферменты, расщепляющие РНК, находят широкое применение в качестве ферментов рестрикции в биотехнологии, в качестве молекулярных инструментов для картирования структуры РНК и генотипирования полиморфизмов в генетике, а также обладают высоким потенциалом в качестве высокоэффективных терапевтических средств.

Развитие злокачественных заболеваний тесно связано с дисбалансом в экспрессии микроРНК, ключевых регуляторов экспрессии генов, подчеркивая перспективность разработки терапевтических стратегий, направленных на их ингибирование. Для направленного подавления микроРНК нами был разработан новый класс ингибиторов, представляющих собой микроРНК-специфические искусственные рибонуклеазы – миРНКазы.

На основе олигонуклеотид-пептидных конъюгатов было разработано несколько конфигураций миРНКаз, отличающихся по структуре олигонуклеотидного домена и включающих каталитический пептид ацетил-[LRLRG]₂-COOH, направленный на определенные функциональные детерминанты микроРНК. Основным преимуществом разработанных ингибиторов является наличие собственной высокой рибонуклеазной активности, позволяющей эффективно расщеплять микроРНК, находящуюся в избытке по отношению к миРНКазе. Кроме того, миРНКазы разработаны таким образом, чтобы образованный гетеродуплекс с микроРНК выступал в качестве субстрата для РНКазы Н. Такая стратегическая конструкция при комбинированном действии с РНКазой Н обеспечивает синергическое расщепление мишени по всем её функциональным областям. Разработанные миРНКазы проявляют высокую биологическую активность, выражающуюся в подавлении пролиферативных и миграционных свойств опухолевых клеток *in vitro* и в ингибировании роста опухоли *in vivo*. В качестве микроРНК-ингибиторов искусственные РНКазы демонстрируют высокую эффективность и открывают новые перспективы для создания прототипов инновационных лекарственных препаратов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 19-74-30011.

Исследование комплекса G – квадруплекса HTel-22 с катионным порфирином методами ЭПР и оптической спектроскопии

Хлынова Т. А.^{1,2}, Санникова Н. Э.^{1,2}, Колоколов М. И.^{1,2}, Крумкачева О. А.^{1,2}

¹ Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Теломераза – фермент, отвечающий за сохранение теломерных концов хромосом, укорачивающихся в ходе клеточного деления. Активность теломеразы не проявляется в соматических клетках, однако, была обнаружена её высокая экспрессия в раковых образованиях. В качестве потенциального решения в лечении онкологических заболеваний было предложено ингибировать активность теломеразы посредством стабилизации G-квадруплексов (G4) при связывании с лигандами. Катионные порфирины являются хорошо изученными лигандами за счет их высокой селективности к G4. Также порфирины активно применяются в терапии как фотосенсибилизаторы (ФС), способные генерировать активные формы кислорода при возбуждении в триплетное состояние. Взаимодействие с лигандами и воздействие света способно приводить к структурным изменениям в G-квадруплексах. Поэтому для успешного терапевтического применения необходимо исследовать структуру комплекса G4 с катионным порфирином и ее изменения в результате фотолиза.

Однако, в силу высокой полиморфности G-квадруплексов возникает проблема исследования их структуры из-за присутствия нескольких конформаций в образце. Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) является информативным методом исследования структуры биополимеров. Двойной электрон – электронный резонанс (DEER, PELDOR) является одним из вариантов импульсного ЭПР, с помощью которого можно извлекать распределение по расстояниям в диапазоне 1,5-10 нм между стабильными спиновыми метками. Недавно предложенная методика лазер-индуцированной магнитной дипольной спектроскопии (LaserIMD) позволяет измерять расстояния между спиновой меткой и фотовозбуждённым триплетным состоянием фотосенсибилизатора. Ранее такой подход не применялся в исследовании нуклеиновых кислот и комплексов ФС с G-квадруплексами.

Таким образом, целью работы являлось продемонстрировать возможность применения метода ЭПР для выявления структурных аспектов образования комплексов порфиринов с олигонуклеотидами на примере HTel-22 / TMRyP4 (мезо-тетра(N-метил-4-пиридил) порфирин). Для достижения поставленной цели решались следующие задачи: установление структуры G-квадруплекса HTel-22 и её изменения при связывании с лигандом TMRyP4, выявление изменения структуры HTel-22 при фотолизе комплекса с TMRyP4.

В ходе работы была впервые продемонстрирована возможность применения импульсной ЭПР спектроскопии для исследования структуры комплексов фотоактивных молекул с G4. Также была определена локализация фотолиганда TMRyP4 в комплексе с HTel-22. Показано, что в результате фотолиза комплекса HTel-22 / TMRyP4 происходит разрушение G-квадруплексов и увеличение доли димерных структур с $16 \pm 5\%$ до $36 \pm 5\%$ для концентраций 0,1 мМ HTel-22 и 0,2 мМ TMRyP4.

Влияние химических модификаций на биологическую активность терапевтических РНК

Черников И.В., Мещанинова М.И., Бачкова И.К., Бишани А., Купрюшкин М.С.,
Зенкова М.А., Черноловская Е.Л.

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

Малые интерферирующие РНК (siРНК) и иммуностимулирующие РНК (исРНК) являются перспективными препаратами для персонализированной медицины.

Конъюгаты siРНК и холестерина (Ch) позволяют доставлять siРНК в клетки без использования трансфекционных агентов. Исследование эффективности и продолжительности действия Ch-siРНК с «легкими» и «тяжелыми» паттернами модификации отличающихся длиной и расположением линкера на биологическую активность siРНК позволило идентифицировать наиболее эффективные конструкции. Подавление экспрессии гена MDR1 на 78% в опухолях KB-8-5 у мышей, демонстрирует преимущество полностью модифицированных (2'F, 2'OMe, PS) Ch-siРНК. Мезильная модификация (μ) является перспективным аналогом фосфотиоатной модификации (PS). Созданы паттерны модификации, содержащие до 26 μ модификаций, сохраняющие высокую биологическую активность siРНК и улучшающие ее фармакологические свойства.

Получен новый тип индуктора РНКi, удобный для синтеза и открывающий возможности для модификаций. Впервые показано, что Ch-супрамолекулярные комплексы с 2'F, 2'OMe и LNA, содержащие от трех до восьми антисмысловых цепей, проявляют интерферирующую активность. Через 4 дня после i.v. введения Ch-содержащие мономеры и супрамолекулярные тримеры снижают уровень мРНК MDR1 в ксенографтной опухоли у мышей на 85% и 68% соответственно. Образование супрамолекулярных структур с тремя или четырьмя антисмысловыми цепями, снабженными концевыми PS модификациями, усиливает их накопление в печени, и вызывают снижение уровня мРНК Ttr на 67%.

Для решения проблемы выхода siРНК из эндосом предложено конъюгировать Ch-siРНК с эндосомолитическими пептидами, а для упрощения синтеза использовать модульные внутренне-сегментированные sisiРНК. Показано, что в присутствии фармакологически разрешенного агента, ингибирующего созревание эндосом, пептидные конъюгаты Ch-sisiРНК снижали экспрессию гена-мишени в 2 – 2,5 раза более эффективно за счет усиления выхода препарата из эндосом.

Ранее наша лаборатория идентифицировала новую иммуностимулирующую 19 п.н. двухцепочечную РНК (исРНК) с 3'-нуклеотидными выступами. Это соединение не только запускает синтез цитокинов, но и ингибирует рост и метастазирование опухолей, а также подавляет репликацию вируса гриппа у мышей. В зависимости от типа модификации, ее расположения в цепи и выбранной цепи, воздействие химических модификаций, таких как 2'-фтор-, 2'-О-метил, фосфотиоат, холестерин и терминальный амин на исРНК, может по-разному изменять ее способность индуцировать интерферон и подавлять пролиферацию опухолевых клеток. Идентифицированы соединения-лидеры с улучшенными антипролиферативными и интерферон-индуцирующими характеристиками.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 19-74-30011.

ПОСТЕРНЫЕ ДОКЛАДЫ

The impact of cytokines and tumor conditioned medium on the properties of murine *ex vivo* generated myeloid-derived suppressor cells

Awad M.S.¹, Zenkova M.A.¹, Markov O.V.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 critical role in immunosuppression. They have been implicated in various pathological conditions, including cancer, inflammation, autoimmune diseases and transplantation. MDSCs can be divided into two subsets: polymorphonuclear (PMN-MDSCs) and monocytic (M-MDSCs), which resemble mature neutrophils and monocytes, respectively. MDSCs use multiple mechanisms to suppress other immune cells, primarily T cells.

Understanding the biological characteristics of MDSCs and identifying novel markers and targets is critical for overcoming tumor-induced immunosuppression and developing potential therapeutic applications in inflammatory and autoimmune diseases. However, the absence of a uniform protocol for the generation of MDSCs *ex vivo* impedes the comprehensive study of these cells, making the development of such protocols an urgent challenge for immunology.

In this study, we compared six different protocols for generating MDSCs *ex vivo* from murine BM precursors. The protocols used granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) alone or in combination with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) or interleukin-6 (IL-6), either with or without tumor conditioned medium (TCM), which have recently been shown to induce expansion and activation of MDSCs *in vivo* [1]. The obtained MDSCs were characterized in terms of their morphology, phenotype, immunosuppressive function on T cell proliferation and gene expression of key immunosuppressive factors.

The results showed that the combination of GM-CSF with IL-6 or G-CSF increased the M-MDSC and PMN-MDSC yields, respectively, compared to GM-CSF alone. The addition of TCM in the protocols resulted in MDSCs with impaired immunosuppressive properties. IL-6 was found to significantly reduce MDSC maturation and differentiation while increasing the expression of immunosuppressive factors. All tested protocols effectively generated MDSCs with potent immunosuppressive properties. These findings contribute to our understanding of the optimal conditions for the tuning of specific characteristics of MDSCs during generation *ex vivo*. The results may facilitate the development of novel approaches to correct the immunosuppressive properties of MDSCs and enhance the targeting of therapeutics to these cells.

[1] P. Trikha and W. E. Carson, "Signaling pathways involved in MDSC regulation," *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1846, no. 1, pp. 55–65, 2014, doi: 10.1016/j.bbcan.2014.04.003.

This work was supported by Russian Science Foundation grant 19-74-30011.

Оценка эффективности доставки функциональных искусственных мРНК катионными липосомами разной композиции на основе 2X3-DOPE и 2X7-DOPE

Антропов Д.Н.¹, Марков О.В.¹, Доме А.С.¹, Пучков П.А.², Макарова Д.М.², Шмендель Е.В.², Гладких Д.В.¹, Матвеева А.М.¹, Журавлев Е.С.¹, Голышев В.М.¹, 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

На данный момент очень актуальна и активно развивается технология мРНК-вакцин и терапевтических мРНК. Данная технология позволяет в короткие сроки получать препараты, способствующие наработке высокого уровня целевого гена в организме, в частности вирусного антигена для выработки специфического иммунного ответа. При этом препараты на основе мРНК низкотоксичны, а также исключают возможность рекомбинации с генетическим материалом. Однако, для эффективного применения важна не только структура самой мРНК, а также выбор композиции для доставки в клетки.

В нашем исследовании мы проводили скрининг липосом на основе поликатионных амфифилов 2X3 и 2X7 и липида-хэлпера DOPE по эффективности доставки искусственных мРНК в клетки человека. Для тестирования эффективности образования комплексов с мРНК были использованы транскрипты, содержащие в своем составе оригинальную комбинацию 5'-UTR-4 и 3'-UTR AES-mtRNR1. Ранее используемые последовательности UTR были описаны независимо в качестве последовательностей, увеличивающих эффективность трансляции искусственных мРНК. Нами были проведены эксперименты на культурах клеток человека, а также на мышах линии Balb/c, подтверждающие, что сконструированная комбинация UTR обеспечивает повышение уровня трансляции мРНК в 6 раз по сравнению с широко используемыми UTR гена β-глобина.

Для подробного описания композиций для доставки мРНК были определены физико-химические характеристики полученных катионных липосом на основе 2X3 и 2X7, такие как размер, поверхностный заряд и индекс полидисперсности и выявлены соотношения N/P наиболее оптимальные для доставки *in vitro*. С учетом полученных данных, в условиях *in vitro* были протестированы комбинации липидов 2X3 и 2X7 и липида-хэлпера DOPE в разных соотношениях в составе липосом. При этом была показана прямая зависимость увеличения эффективности доставки репортерных мРНК в клетки человека от увеличения содержания DOPE в составе композиции. При внутримышечном введении мышам линии Balb/c мРНК Luc2 в составе липоплексов, полученных при использовании липосом 2X3-DOPE 1:3 и 2X7-DOPE 1:3 была показана продолжительная трансляция мРНК (до 8 дней) с высоким уровнем специфического люминесцентного сигнала.

В настоящее время в рамках развития мРНК-технологий основной задачей является разработка устойчивой технологии получения самих молекул мРНК и компонентов липидных оболочек, которые будут востребованы при создании средств доставки мРНК-препаратов. Наше исследование демонстрирует возможность улучшения структуры искусственных мРНК для обеспечения более высокого уровня экспрессии целевого гена, а также показывает перспективность разработки систем доставки на основе липосомальных композиций 2X3-DOPE и 2X7-DOPE.

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

Выявление точечных мутаций в ДНК методом ПЦР с помощью ФАО

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

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

Мутации ДНК в соматических клетках являются важным фактором малигнизации клеток. Примером таких мутаций являются однонуклеотидные полиморфизмы, вызывающие различные заболевания, такие как рак, диабет и т.д. Выявление мутаций имеет важное значение с точки зрения ведения пациентов и направленного лечения заболеваний, а как известно, что наличие замены нуклеотида является эффективным маркером различных заболеваний. Для детектирования мутаций доступно множество методов, например аллель-специфическая полимеразная цепная реакция в реальном времени (АС-ПЦР), капельная цифровая ПЦР, секвенирование нового поколения и т.д. Преимущества АС-ПЦР заключаются в универсальности, скорости и дешевизне метода.

В АС-ПЦР используются специфические олигонуклеотидные праймеры для амплификации ДНК-мишени с мутацией на фоне ДНК дикого типа. На эффективность ПЦР анализа оказывает влияние множество факторов, структура праймеров определяет ее в значительной степени, что заставляет выбирать их нуклеотидную последовательность в ходе рационального дизайна. Для достижения высокой чувствительности, селективности и специфичности выявления мутаций, эффективно используются олигонуклеотидные производные, в состав которых введены модифицированные фрагменты.

В настоящей работе предложены новые производные олигонуклеотидов – фосфорамидные азольные олигонуклеотиды (ФАО), модифицированные по фосфатному остатку N-бензоазольными группами [1]. Нами отработана схема введения таких фрагментов в ходе автоматического олигонуклеотидного синтеза, позволяющая с высоким выходом получать последовательности ДНК 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 молекулярное влияние сайт-специфической модификации ФАО в праймере и матрице на синтез полноразмерного продукта удлинения Taq ДНК-полимеразой и эффективность ПЦР

Определены закономерности влияния числа модификаций и их положения в составе праймера на эффективность и специфичность выявления полиморфизмов методом АС-ПЦР на примере мутации в гене KRAS с использованием модельной мутантной плазмидной ДНК на фоне ДНК дикого типа. Полученные результаты указывают на перспективность использования новых аналогов нуклеиновых кислот для решения научных и практических задач с использованием метода ПЦР [2].

1. Vasilyeva, S. V. et al. // *ACS omega*. 2023. Vol. 8. N. 1. P. 1556-1566.

2. Chubarov, A. S. et al. // *Int. J. Mol. Sci*. 2024. Vol. 25. N. 1. P. 617.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантом РНФ № 23-14-00358 и государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

Амфифильные производные олигонуклеотидов: особенности самосборки и нековалентных взаимодействий с сывороточным альбумином человека

Бауэр И. А.^{1,2}, Жарков Т. Д.², Жуков С. А.², Купрюшкин М. С.², Дмитриенко Е. В.^{1,2}

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

Последние достижения в области генетики и химии нуклеиновых кислот позволили создать принципиально новые терапевтические препараты, избирательно воздействующие на причину заболевания. Однако, несмотря на достигнутые успехи, остаются нерешенными проблемы улучшения фармакокинетических свойств терапевтических олигонуклеотидов при сохранении их биологической активности. Одним из перспективных подходов является синтез модифицированных олигонуклеотидов, содержащих гидрофобные остатки для повышения их эффективности проникновения в клетки и улучшения фармакокинетических свойств. Понимание механизмов взаимодействия таких производных с сывороточным альбумином человека (HSA), самым распространенным белком плазмы крови, может обеспечить новые возможности и свойства для терапевтических олигонуклеотидов амфифильной природы, такие как повышенная стабильность, снижение иммунного ответа и контролируемое биораспределение.

В ходе работы установлено, что введение триазиламидофосфатной, фосфорилгуанидиновой или сульфониламидофосфатной модификаций, содержащих протяженные алкильные группы, на 3'-конец олигонуклеотидной последовательности незначительно влияет на ее сродство к комплементарной последовательности. Исследуемые амфифильные олигонуклеотиды способны образовывать самособирающиеся мицеллоподобные ассоциаты размером 8-30 нм. Олигонуклеотиды с липофильными группами образуют устойчивые комплексы с HSA с константой диссоциации $\sim 10^{-6}$ М. При этом мицеллоподобные структуры олигонуклеотидов разрушаются при связывании с белком. Исследуемые триазиламидофосфатные олигонуклеотидные производные, как по отдельности, так и в комплексах с HSA, способны эффективно проникать в клетки HEK293 и T98G. Показано, что триазиламидофосфатные производные антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на мРНК GFP, проявляют умеренную общую цитотоксичность не более 20%, а их биологическая активность *in vitro* в подавлении синтеза GFP превышает эффективность нативных олигонуклеотидов.

В настоящей работе представлено изучение особенностей самосборки, формирования нековалентных ассоциатов с HSA, а также проникновения в клетки новых амфифильных производных олигонуклеотидов. Полученные данные, а также уже известные факты, что они обладают повышенной устойчивостью к клеточным нуклеазам и не проявляют значительной цитотоксичности, делают их перспективными кандидатами для биомедицинских разработок.

Авторы выражают благодарность Григорьевой Е.В., Гуляевой О.С. и Коваль О.А. за помощь в проведении клеточных экспериментов и цитометрии.

Исследование было поддержано в рамках гранта РНФ № 21-64-00017.

Мезильные модификации увеличивают эффективность действия siРНК *in vivo*

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

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Терапевтические препараты на основе малых интерферирующих РНК (siРНК) подавляют экспрессию генов по механизму РНК-интерференции. Для защиты от расщепления нуклеазами организма в состав siРНК включают химические модификации. Мезильная (μ) модификация является перспективным аналогом широко используемой в составе siРНК фосфотиоатной модификации (PS), поскольку она обеспечивает большую нуклеазоустойчивость и не проявляет токсичности.

Для 2'-ОМе/2'-F анти-MDR1 siРНК, содержащих одну μ модификацию в различных положениях дуплекса, были определены IC_{50} на культуре клеток KB-3-1-MDR1-GFP и рассчитана относительная активность (Отн_А) как отношение IC_{50} контрольной siРНК к IC_{50} siРНК с модификациями фосфатной группы. Показано, что одна μ модификация в 27 из 28 исследованных положений дуплекса практически не снижает биологическую активность siРНК (Отн_А = 0.66-2.5) *in vitro*. Исключение составила siРНК, содержащая μ в 1 положении антисмысловой цепи, активность которой снижалась на порядок (Отн_А = 0.12). На основании этих данных были созданы паттерны μ модификаций с Отн_А = 0.41-0.77, что близко к активности siРНК с общепринятым паттерном концевых PS модификаций (Отн_А=0.57).

Исследование биологической стабильности siРНК в гомогенате печени мыши показало, что время полужизни siРНК с 2 PS модификациями по концам каждой цепи составляет около 4 дней и она разрушается преимущественно экзонуклеазами. Вместе с тем, время полужизни μ -модифицированных siРНК составляло более 11 дней.

Для исследования кинетики действия siРНК *in vivo*, холестеринные конъюгаты анти-Ttr siРНК (8.5 мкг/г) внутривенно вводили мышам C57BL/6, уровень TTR в сыворотке крови определяли с помощью ИФА. Показано, что, на протяжении первых 4 недель после введения, siРНК, содержащая 13 μ модификаций, действует так же эффективно как siРНК с концевыми PS модификациями, однако через 6-10 недель после трансфекции она обеспечивает в 3 раза более эффективное подавление экспрессии TTR. Так, на 10 неделю после введения PS-модифицированной siРНК уровень TTR в сыворотке составлял 49% от исходного, а после введения μ -модифицированной siРНК – всего 15%.

Таким образом, было впервые проведено систематическое исследование влияния μ модификации на свойства siРНК, и показано, что μ модификация значительно повышает биологическую стабильность siРНК и, при использовании в составе оптимальных паттернов, не нарушает процесс РНК-интерференции, что обеспечивает эффективное действие конъюгатов siРНК *in vivo*.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 19-74-30011.

Введение фосфорилгуанидиновой модификации в праймеры как фактор, увеличивающий их дискриминирующую способность, при аллель-специфической ПЦР

Булгакова А. Е.¹, Кабилов М. Р.¹, Дмитриенко Е. В.¹

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

Детекция и анализ нуклеиновых кислот (НК) являются одними из наиболее значимых проблем всемирного здравоохранения, из-за острой необходимости обнаружения возбудителей социально-значимых инфекций, мониторинга патологий и клинической диагностики. Однако, накладываются трудности на анализ НК, в том числе при обнаружении однонуклеотидных замен, которые могут стать причиной различных патологий и влиять на эффективность лечения. В связи с чем требуется усовершенствование систем диагностики НК для снижения потерь от социально-значимых заболеваний.

Авторами было проведено исследование влияния положения и количества фосфорилгуанидиновых (ФГ) модификаций в праймерной цепи на процессивность *Taq* ДНК-полимеразы. Было проанализировано 38 вариантов удлиняемых праймеров, содержащих ФГ-модификации как в зоне связывания с ферментом, так и за его пределами. Предсказано влияние модификации на эффективность выхода полноразмерного продукта удлинения, при этом наибольшее влияние оказывает введение модификации в первый с 3'-конца фосфат.

С учетом полученных данных синтезирована библиотека олигонуклеотидов, несущих ФГ-модификацию в третьем от 3'-конца положении, а также два статистических нуклеотида в непосредственной близости с ФГ-модификацией, для изучения их совместного влияния в процессе аллель-специфической (АС) ПЦР. Данная система была исследована на матрице дикого типа и с мутациями, причем праймеры с ФГ-модификациями выступают в качестве блокеров, ингибируя удлинение матрицы дикого типа. Так, некоторые пары праймеров ингибируют ПЦР в случае наличия мисматча, и при этом наличие ФГ-модификации приводит к еще большему ингибированию, чем в его отсутствии.

Секвенирование полученных в ходе АС-ПЦР продуктов показало, что введение ФГ-модификации в третий межнуклеотидный фосфат со стороны 3'-конца в полностью комплементарный праймер позволяет получить полностью комплементарный продукт. Стоит отметить, что количество прочтений, соответствующих полноразмерному продукту АС-ПЦР, включая зоны праймеров, снижается при использовании праймеров с мисматчем, при этом в случае наличия ФГ-модификации ингибирование происходит эффективнее. Также в случае использования библиотеки праймеров без мисматча в 3'-положении, наличие ФГ-модификации полностью ингибирует образование несовершенных продуктов.

Таким образом показано, что включение ФГ-модификации в праймеры приводит к усилению различия между ДНК дикого типа и мутированной ДНК, обеспечивая высокую дискриминирующую способность праймеров в АС-ПЦР.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (№ 22-24-00996) и государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (№ 121031300042-1).

Разработка новых производных (олиго)нуклеотидов с гетероциклическими фосфатными модификациями

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

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

Разработаны новые производные олигонуклеотидов, содержащие межнуклеотидные N-бензоазольные фосфорамидные группы, - фосфорамидные азольные олигонуклеотиды (ФАО). Модификации вводили в структуру олигомеров с помощью реакции Штаудингера с соответствующими азидами в ходе стандартного автоматического твердофазного метода синтеза. Основное отличие новых модификаторов от уже известных заключается в том, что они представляют собой объемные гетероциклические структуры, аналогичные пуриновым нуклеозидным основаниям, свойства которых можно направленно варьировать. Возможность введения множественных модификаций с различными свойствами в любое положение олигонуклеотидов в процессе автоматического синтеза ДНК является принципиальным и критическим для их применения [1,4].

Определена эффективность гибридизации ФАО с ДНК и РНК, а также структура таких комплексов. Показано, что можно варьировать заряд и гидрофобность ФАО путем введения различных бензоазольных модификаций.

Для выяснения перспективности использования ФАО в системах ПЦР диагностики была выбрана модель, в которой выявляли точечные мутации в гене саркомы крысы Кирстена (KRAS). Полученные данные указывают на высокую перспективность применения ФАО в системах ПЦР диагностики, в которых обычные олигонуклеотиды не дают требуемых результатов [2,4].

Разработаны эффективные протоколы синтеза новых соединений - нуклеозидных 5'- α -имидофосфатов с использованием реакции Штаудингера. Эти вещества представляют собой альфа-фосфатные миметические нуклеотиды, в которых атом кислорода заменен на N-бензоазольные фосфорамидные группы. Были получены различные 5'-иминомонофосфаты нуклеозидов, а также тимидин 5'-(1,3-диметилимидазолидин-2-илиден)-трифосфат (ppp(DMI)T).

Было показано, что ppp(DMI)T может служить субстратом для катализируемого ферментом шаблон-независимого синтеза ДНК с помощью человеческой терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы TdT [3].

1. Vasilyeva S.V., Baranovskaya E.E., Dyudeeva E.S., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. // *ACS Omega*- 2023. – V. 8. – P 1556–1566.
2. Chubarov, A.S.; Baranovskaya, E.E.; Ocorbin, I.P.; Yushin, I.I.; Filipenko, M.L.; Pyshnyi, D.V.; Vasilyeva, S.V.; Lomzov, A.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 617.
3. Vasilyeva S.V., Kuznetsova A.A. Baranovskaya E.E., Kuznetsov N.A., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. // *Bioorganic Chemistry* -2022. - V. 127,- P. 105987.
4. Заявка на патент РФ приоритет от 26.04.23., рег. № 2023110694: «Фосфорамидные азольные олигонуклеотиды, способ синтеза фосфорамидных азольных олигонуклеотидов и способ матричного ферментативного синтеза ДНК с их использованием».

Исследование было частично поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 123021600208-7, и проектами РНФ 23-14-00358 и 21-64-00017.

Исследование способов увеличения эффективности комплементарных взаимодействий ДНК-зондов, иммобилизованных на наночастице золота и на нитроцеллюлозной мембране, в иммунохроматографических тест-системах

Горбунова Е. А.¹, Епанчинцева А. В.¹

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

Типичная иммунохроматографическая тест-система состоит из трех основных частей: подложка для образца, детектирующая мембрана и адсорбирующая подложка. Тестирование выполняется путем нанесения анализируемого раствора на подложку для образца, далее раствор движется под действием капиллярных сил через поры мембраны, спустя непродолжительное время (до 1 ч) определяется положительный или отрицательный результат теста с соответствующим визуальным проявлением контрольной и тестовой полос. Для визуализации полос чаще всего используются наночастицы золота (НЧЗ) благодаря их исключительным адсорбционным свойствам, химической инертности, высокому молярному коэффициенту поглощения, а также возможностью модификации их поверхности, в частности олигонуклеотидами.

Цель данной работы - разработка принципиальной схемы функционирования тест-системы на основе НЧЗ и модельных ДНК-мишеней, ассоциированных с лекарственной устойчивостью микобактерии туберкулеза, а также комплементарных им ДНК-зондов с достоверным визуальным выявлением контрольной полосы тест-системы.

Были исследованы способы повышения специфических и минимизации неспецифических взаимодействий между олигонуклеотидами, иммобилизованными на контрольной линии нитроцеллюлозной мембраны (НЦМ), и ДНК-зондами на НЧЗ. Для обеспечения протекания анализируемого раствора через мембрану исключительно за счет капиллярных сил НЦМ фиксировали на клейкой подложке.

Показано, что при нанесении контрольной точки на НЦМ на вакуумном столе формируется менее диффузная, более однородная по плотности окрашивания контрольная точка в сравнении с ее нанесением при атмосферном давлении. С увеличением количества стрептавидина в контрольной точке усиливается уровень неспецифических взаимодействий НЧЗ и НЦМ. В то же время количество иммобилизованного стрептавидина с биотинилированным олигонуклеотидом захвата в контрольной точке определяет чувствительность системы. Наилучшие результаты показала тест-полоска, содержащая в контрольной точке 12,5 пмоль стрептавидина с двукратным молярным избытком олигонуклеотида захвата.

Также было показано, что на чувствительность системы влияет геометрия тест-полоски, в частности, ширина и длина НЦМ и расстояние от подушки для образца до контрольной точки.

При исследовании НЦМ с размером пор 0,22, 0,45, 5 и 8 мкм было показано, что с увеличением размера пор НЦМ снижается уровень неспецифических взаимодействий НЧЗ с НЦМ, однако увеличивается диффузность контрольного пятна. Использование НЦМ с размером пор 0,22, 0,45 и 5 мкм без обработки детергентами затруднено из-за их низкой смачиваемости. Между тем чувствительность анализа может снижаться при использовании раствора Tween 20 с концентрацией выше 0,25%.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 23-24-00505.

Фоторегулируемые системы CRISPR/Cas9 с использованием фоточувствительных направляющих РНК

Горленко Е. С.^{1,2}, Саковина Л. В.^{1,2}, Новопашина Д. С.^{1,2}

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Перспективным подходом к созданию молекулярно-биологических систем с регулируемой активностью является введение фоточувствительных компонентов в состав нуклеотидных конструкций. Так, облучение светом определенной длины волны приводит к расщеплению или изменению структуры фоточувствительных вставок, что позволяет изменять функциональную активность модифицированных олигонуклеотидов и «включать» и/или «выключать» созданные системы.

Целью данной работы является создание фоторегулируемых систем CRISPR/Cas9 с использованием фоточувствительных направляющих РНК.

В данной работе нами предложено два подхода к регуляции направленного расщепления ДНК нуклеазой Cas9 с использованием облучения светом определенной длины волны. Первый подход относится к необратимой регуляции и предполагает активацию системы CRISPR/Cas9 с использованием циклических направляющих РНК, содержащих специально синтезированный фоторасщепляемый линкер на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола. До УФ-облучения система инактивирована за счет циклической структуры crРНК. При воздействии ультрафиолетом (365 нм) происходит расщепление фотолинкера и линеаризация crРНК, при этом восстанавливается ее функциональная активность.

Второй подход представляет собой обратимую регуляцию с использованием crРНК, содержащих фотолинкеры на основе азобензола, которые способны изменять конформацию в зависимости от длины волны облучения. В рамках этого подхода было опробовано два варианта. В первом варианте использовали фотолинкеры, в которых остаток азобензола направлен в сторону от рибозофосфатного остова. При облучении видимым светом (505 нм) транс-изомер фотолинкера интеркалирует в комплементарную цепь, что активирует расщепление ДНК-мишени. УФ-облучение (365 нм) обеспечивает переход фотолинкера в цис-изомер, что вызывает стерические затруднения и блокирование работы системы. Во втором варианте использовали фотолинкер, в котором азобензол находится в составе рибозофосфатного остова. В зависимости от длины волны облучения изменяется конформация линкера, а вслед за ним и пространственная структура всей направляющей РНК, что приводит к активации (транс-изомер) или дезактивации (цис-изомер) расщепления ДНК нуклеазой Cas9. Дополнительно на модельных олигонуклеотидах было исследовано влияние фоточувствительных модификаций на физико-химические свойства РНК и стабильность их комплексов.

Полученные результаты подтверждают перспективность созданных систем с использованием фоточувствительных линейных и циклических направляющих РНК в составе CRISPR/Cas9 для регуляции активности расщепления ДНК-мишени.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 22-14-00294.

Олигонуклеотидные антибактериальные агенты, взаимодействующие с РНКазой Р

Данилин Н.А.^{1,2}, Бардашева А.В.¹, Матвеев А.Л.¹, Новопашина Д.С.¹

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Возникновение устойчивости бактерий к лекарственным препаратам является одной из главных проблем современной биологии, биотехнологии и медицины. Кроме того, большинство антибиотиков, обладают рядом негативных побочных реакций, что ограничивает возможности их применения. Интересным вариантом решения данных проблем является создание антибактериальных агентов нового типа на основе олигонуклеотидных конструкций, направленных на бактериальную РНКазу Р, которая участвует в процессинге тРНК. Ингибирование этого жизненно важного для бактериальных клеток фермента должно приводить к их гибели [1]. С использованием олигонуклеотидов РНКазу Р можно направить на расщепление ключевых для бактерии мРНК, что также должно подавлять рост бактерий. Для увеличения эффективности проникновения олигонуклеотидных конструкций необходимо добавить в конструкцию молекулы доставщика, например, проникающие пептиды.

Целью работы было создание пептидных конъюгатов ингибирующих или направляющих РНКазу Р олигонуклеотидов, исследование влияние пептидной составляющей на способность олигонуклеотида ингибировать или направлять действие РНКазы Р в модельной системе, а также исследование способности полученных конъюгатов проникать в клетки бактерий и ингибировать их рост.

Конъюгаты олигонуклеотидов с пептидами олигонуклеотидов были получены методом тиол-малеимидной химии. Исследовано влияние пептида на способность олигонуклеотидного модуля ингибировать РНКазу Р либо направлять ее для расщепления определенной нуклеотидной последовательности в РНК. Обнаружено, что для ингибирующих олигонуклеотидов в большинстве случаев присоединение пептида имеет негативное влияние на ингибирующие свойства. В случае направляющих олигонуклеотидов присоединение пептида может влиять как негативно, так позитивно и зависит от природы самого пептида. Введение СРР-пептида (фрагмент поверхностного белка Т клеток человека) приводило к значительному увеличению скорости гидролиза РНК-мишени для всех типов олигонуклеотидов. Мы тестировали также способность полученных конъюгатов проникать в клетки бактерий и ингибировать их рост. Было показано, что наличие пептида в ряде случаев значительно увеличивает степень проникновения конъюгата, выявлены несколько вариантов олигонуклеотид-пептидных конъюгатов с повышенной отнесительно свободного олигонуклеотида бактериостатической активностью.

Таким образом, полученные пептидные конъюгаты олигонуклеотидов, способные взаимодействовать с бактериальной РНКазой Р, можно рассматривать в качестве основы для новых антибактериальных средств.

1. Novopashina D.S. et al. *Front. Pharmacology*. - 2019. - V.10. - P.813.

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

Исследование подходов к созданию CRISPR/Cas9 системы с возможностью аллостерической регуляции на уровне направляющей РНК

Должикова О.А.^{1,2}, Мещанинова М.И.², Новопашина Д.С.²

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

CRISPR/Cas9 система является универсальным инструментом воздействия на геном. Одним из подходов к снижению уровня нецелевых эффектов является создание систем с возможностью регуляции их активности во времени и пространстве. Для создания аллостерически регулируемых CRISPR/Cas9 систем можно сконструировать направляющие РНК, несущие в своём составе аптамер к малой молекуле. В данной работе мы подбирали оптимальную стратегию для создания регулируемых систем на примере модельной системы с аптамером к теофиллину.

Целью данной работы являлся дизайн направляющих РНК, содержащих аптамер к теофиллину в разных структурных элементах направляющих РНК (crРНК, tracrРНК, sgРНК): верхний стебель, связующая петля, 3'-концевые шпильки, 3'- или 5'-конец, и сравнение эффективности активации либо дезактивации CRISPR/Cas9 систем при добавлении теофиллина. Предварительно было продемонстрировано сродство выбранного варианта РНК-аптамера к теофиллину. При дизайне систем исходили из предположения, что связывание аптамерного фрагмента РНК с теофиллином изменит его пространственную структуру и повлечет за собой структурные перестройки всей направляющей РНК с изменением ее сродства к белку Cas9.

Нами было проведено исследование влияния введения аптамера в разные структурные элементы направляющих РНК (crРНК, tracrРНК, sgРНК) на активность CRISPR/Cas9 систем и изменения активности этих систем при добавлении теофиллина. Были выявлены системы, способные как активироваться, так и дезактивироваться в присутствии теофиллина.

Таким образом, введение выбранного теофиллинового аптамера в состав направляющих РНК позволяет создавать системы геномного редактирования, эффективность действия которых можно регулировать с использованием теофиллина.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 22-14-00294.

Синтез и исследование свойств конформационно замкнутых фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов

Дюдеева Е.С.¹, Ляпин П.К.¹

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

Олигонуклеотиды и их модифицированные аналоги широко используются для решения спектра теоретических и прикладных задач, включая разработку современных диагностических систем и терапевтических средств. Комбинируя различные типы химических модификаций, возможно создать новые, более совершенные варианты олигонуклеотидного инструментария с заранее заданными физико-химическими и молекулярно-биологическими свойствами.

В данной работе были впервые синтезированы и охарактеризованы олигонуклеотиды, содержащие одновременно два типа модификаций – фосфорилгуанидиновую группировку (PG) [1] и 2',4'-замкнутые остатки рибозы (LNA) – в том числе в составе одного нуклеотидного звена. Введение данных модификаций приводит к увеличению времени удерживания олигонуклеотидов на фазе C-18 при проведении ОФХ, а также к снижению электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле по сравнению с нативным аналогом. Методом термической денатурации показано, что введение PG-LNA звеньев существенно стабилизирует комплементарные ДНК-дуплексы в том числе в растворах с низкой ионной силой (1,6–4,5 °C на одну модификацию). Также методом спектрополяриметрии кругового дихроизма установлено, что при введении нескольких PG-LNA модификаций искажается пространственная структура ДНК-комплекса, что, вероятно, свидетельствует о частичном переходе из Б-формы в А-форму за счет наличия LNA-фрагментов [2].

PG-LNA олигонуклеотиды были протестированы на стабильность к воздействию эндонуклеазы ДНКазы I. Показано, что 17-звенный PG-LNA «гапмер» существенно стабильнее нативного или PG аналога. Частичная деградация PG-LNA олигонуклеотидов наблюдается в том случае, если модификации удалены друг от друга по крайней мере на 3 нуклеотидных звена.

Повышенное сродство PG-LNA олигонуклеотидов к комплементарным НК в сочетании с их стабильностью к воздействию нуклеаз делает их перспективной платформой для создания терапевтических нуклеиновых кислот, используемых *in vivo*. Например, в пилотном эксперименте методом проточной цитофлуориметрии показано, что PG-LNA олигонуклеотиды могут подавлять экспрессию гена GFP в модельной клеточной линии HEK eGFP, то есть способны выступать в качестве антисенс-агентов.

1. Kupryushkin M. S., Pyshnyi D. V., Stetsenko D. A. *Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic acid analogues* // *Acta Naturae* – 2014. – V. 6. – №. 4 (23). – P. 116-118
2. Pabon-Martinez Y. V. et al. *LNA effects on DNA binding and conformation: from single strand to duplex and triplex structures* // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 11043

Авторы выражают благодарность Коваль О.А., Павловой А.С., Гуляевой О.А. за помощь с проведением эксперимента по проточной цитофлуориметрии.

Исследование было поддержано грантом РНФ 24-24-20105 и правительства Новосибирской области.

Подход к определению однонуклеотидной мутации с использованием нековалентных ассоциатов наночастиц золота и флуоресцентно меченных олигонуклеотидов

Епанчинцева А. В.¹, Горбунова Е. А.¹

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

Туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью с дополнительной устойчивостью микобактерии туберкулеза (МБТ) к фторхинолону – одна из наиболее сложных для лечения видов резистентности МБТ. Существует потребность в разработке тест-систем, позволяющих быстро и достоверно выявлять больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью.

Наночастицы золота (НЧЗ) являются перспективными носителями нуклеиновых кислот благодаря их уникальным физико-химическим свойствам и биосовместимости. Большинство тест-систем на основе НЧЗ для выявления мишеней нуклеотидной природы используют ассоциаты НЧЗ с адсорбированными на их поверхности олигонуклеотидными зондами. Работа таких систем принципиально основана на двух явлениях: (1) гибридизации нуклеотидной мишени, присутствующей в растворе, с комплементарным ей зондом, адсорбированным на поверхности НЧЗ, (2) способности коллоида НЧЗ менять цвет с винно-красного на пурпурно-синий при сближении НЧЗ друг с другом.

Наш предшествующий опыт позволяет получать носители НК на основе НЧЗ с программируемой нагрузкой поверхности молекулами ДНК-зондов для разрабатываемой тест-системы. При анализе литературных данных выбрали одну из возможных однонуклеотидных мутаций в последовательности гена *gyrA* МБТ, кодирующий устойчивость МБТ к фторхинолонам, а именно мутацию, приводящую к замене аминокислотного остатка Asp-94 на Ala.

Изучение термической стабильности дуплексов, образуемых в системе ДНК-зондов и двух мишеней, дикого типа и содержащей мутацию, выявило возможность детекции однонуклеотидной замены в условиях, потенциально иницирующих неодинаковую по эффективности адсорбцию образованных дуплексов, свободных зондов и мишеней на поверхность НЧЗ, приводящую к различающейся устойчивости конечных ассоциатов НЧЗ-ДНК к солевой агрегации.

Было проведено детальное исследование нековалентных взаимодействий ДНК-зондов и, с одной стороны, частично или полностью комплементарных им мишеней, а, с другой стороны, НЧЗ, имеющих высокое сродство к молекулам ДНК практически любого состава, в особенности к флуоресцентно меченым. Было показано, что использование пары зондов, несущих остаток флуорофора, позволяет добиться достоверной дифференциации мишеней дикого типа и мутантной, выявляемой методами спектроскопии оптического поглощения и динамического светорассеяния.

Таким образом, на модельной системе, состоящей из коротких фрагментов ДНК и НЧЗ, были определены условия дуплексообразования с последующей адсорбцией ДНК на НЧЗ, позволяющие дифференцировать мутантную мишень от мишени дикого типа в наномолярных концентрациях за счет образования наноструктур разного строения.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 23-24-00505.

Циркулирующая внеклеточная ДНК и анти-ДНК антитела у пациентов с ревматическими заболеваниями

Ермаков Е. А.^{1,2}, Новикова Т. С.^{1,2}, Меламуд М. М.¹, Коньков В. В.¹, Кляус Н. А.³,
Сизиков А. Э.¹, Невинский Г.А.^{1,2}, Бунева В. Н.^{1,2}

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России

Циркулирующая внеклеточная ДНК (вкДНК) рассматривается как перспективный биомаркер ряда аутоиммунных ревматических заболеваний. Известно, что гибель клеток способствует увеличению концентрации вкДНК и образованию анти-ДНК антител. Однако ассоциация концентрации вкДНК с уровнем антител к одноцепочечной (анти-оцДНК) и двуцепочечной (анти-дцДНК) ДНК при ревматических заболеваниях плохо изучена.

Данная работа посвящена изучению концентрации общей вкДНК и антител к анти-оцДНК и анти-дцДНК в плазме крови у пациентов с ревматоидным артритом (РА), системной красной волчанкой (СКВ), анкилозирующим спондилитом (АС), псориатическим артритом (ПсА) и здоровых доноров.

В работе использована плазма крови пациентов с РА (n=89), АС (n=67), СКВ (n=36), ПсА (n=22) и здоровых доноров (n=76). Выделение общей вкДНК из плазмы проводилось с помощью набора D-Blood-250 (Biolabmix, Новосибирск, Россия). Концентрация вкДНК определялась методом флуориметрии набором Qubit dsDNA HS Assay Kit на приборе Qubit 4 (ThermoFisher, Германия). Определение концентрации анти-оцДНК и анти-дцДНК антител осуществлялось методом иммуноферментного анализа (Вектор-Бест, Новосибирск).

Показано, что концентрация вкДНК в плазме крови пациентов с СКВ оказалась статистически значимо в 1,5 раза выше, чем у здоровых лиц (медианные значения составили 23,9 и 16,3 нг/мл, соответственно). Концентрация вкДНК в плазме пациентов с РА, АС и ПсА не отличалась и соответствовала медианным значениям для здоровых доноров. Уровень анти-ДНК антител повышался при СКВ, причём как к оцДНК, так и дцДНК. При остальных заболеваниях повышение концентрации анти-ДНК антител не наблюдалось, за исключением пациентов с РА, у которых обнаруживалось повышение анти-дцДНК антител. Уровень анти-дцДНК антител при СКВ коррелировал с баллами по шкале SELENA-SLEDAI ($R=0.53$; $p=0.019$).

Таким образом, повышение концентрации вкДНК при СКВ ассоциировано с высоким уровнем анти-ДНК антител, наличие которых является одним из критериев для постановки диагноза, поэтому вкДНК может рассматриваться как дополнительный клинический биомаркёр СКВ.

Исследование поддержано грантом РФФ № 23-15-00357.

Модификация Вос-протокола твердофазного синтеза отрицательно заряженных пептидно-нуклеиновых кислот (ОЗ ПНК)

Есенина А. А.¹, Прохоров И. А.¹, Кириллова Ю. Г.¹

¹ МИРЭА – Российский технологический университет,
институт тонких химических технологий им. М.В.Ломоносова,
кафедра биотехнологии и промышленной фармации, Москва, Россия

ПНК - класс синтетических аналогов нуклеиновых кислот, в которых сахаро-фосфатный остов радикально заменен на псевдопептидный [1]. Применение первоначально разработанных незаряженных аминоксилглицин (*aeg*-) ПНК ограничено ввиду недостаточной растворимости в воде и трудностях при доставке в клетку [2]. Модификация молекул путем введения карбоксиэтильного остатка в γ -положение мономеров ПНК, обеспечивающего отрицательный заряд молекулы, позволяет преодолеть эти ограничения.

На данный момент существуют проблемы с синтезом таких соединений. Применяемые для *aeg*-ПНК стандартные протоколы твердофазного синтеза [3] предписывают использование сильноокислых условий отщепления олигомеров с полимерного носителя, которые оказались слишком жесткими для γ -*se*-ПНК, что не позволяет получать целевые соединения в достаточном для дальнейших исследований количествах.

В ходе работы были проведены синтезы модельных олигомеров ПНК, содержащих γ -*se*-мономер, по модифицированным протоколам. Установлено, что введение линкера между полимерным носителем и олигомером ПНК снижает деградацию последовательности при отщеплении в сильноокислых условиях, а применение селективно расщепляемого глицилгликолатного линкера и основных условий отщепления способствуют кратному увеличению выхода.

1. Nielsen P. E., Egholm M., Berg R. H., Buchardt O. *Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide* // *Science*. - 1991. - V. 254. - P. 1497-1500.
2. Brodyagin N., Katkevics M., Kotikam V., Ryan C. A., Rozners E. *Chemical approaches to discover the full potential of peptide nucleic acids in biomedical applications* // *Beilstein J Org Chem*. - 2021. - V. 17 (1). - P. 1641-1688.
3. Dezhnikov A. V., Tankevich M. V., Nikolskaya E. D., Smirnov I. P., Pozmogova, G. E., Shvets V. I., Kirillova, Y. G. *Synthesis of anionic PNA oligomers including γ -carboxyethyl thymine monomers* // *Mend. Comm.* - 2015. - V. 25(1). - P. 47-48.

Особенности автоматического синтеза триазиламидофосфатных олигонуклеотидных производных

Жарков Т.Д.¹, Валяев А.В.^{1,2}, Купрюшкин М.С.¹

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

² Факультет естественных наук, Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия

На сегодняшний день синтетические олигонуклеотиды широко используются в различных областях молекулярной биологии, биотехнологии, медицины. Они могут применяться как праймеры для ПЦР, молекулярные зонды для селективного детектирования последовательностей нуклеиновых кислот (НК) [1], и, в частности, в качестве уникальных терапевтических препаратов. Последнее направление сейчас активно развивается – организацией FDA (Food & Drug Administration) уже одобрено более 20 олигонуклеотидных препаратов для лечения различных генетических заболеваний [2]. Все подобные препараты представляют собой модифицированные олигонуклеотиды. Модификации в составе олигонуклеотидов направлены на улучшение некоторых их свойств, критически важных при их использовании в качестве препаратов. К таким свойствам можно отнести, например, селективность биораспределения в организме, химическая и ферментативная стабильность препарата, сниженная цитотоксичность, улучшенное проникновение олигонуклеотида через клеточные мембраны. Немаловажным аспектом, отражающим перспективность применения тех или иных модификаций НК, является совместимость со стандартными протоколами твердофазного синтеза и возможность полной автоматизации процесса получения модифицированных олигонуклеотидов. В связи с этим, проверка возможности введения модификаций НК в автоматическом варианте представляет интерес.

В представленной работе разработанные ранее методы получения триазиламидофосфатных олигонуклеотидов были впервые применены в полностью автоматическом режиме. Все методы основаны на проведении реакции Штаудингера между фосфит-триэфирным производным олигонуклеотида и различно-замещенными азидо-1,3,5-триазинами. Было показано, что реакционноспособный 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазин не может быть использован для автоматического синтеза в силу низкой стабильности интермедиата реакции Штаудингера. В то же время, различные 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазины, содержащие компактные остатки аминов в триазиновом остове, могут встраиваться в состав олигонуклеотида в автоматическом режиме с высокой эффективностью. С использованием подобного реагента, содержащего остаток аммиака, были получены в том числе и множественно модифицированные олигонуклеотиды, содержащие вплоть до трех модификаций подряд. Таким образом, новый класс триазиламидофосфатных олигонуклеотидов можно рассматривать как перспективный с точки зрения возможности полностью автоматического синтеза.

1. Juskowiak B. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399(9), 3157–3176.

2. Belgrad J., Fakih H. H., Khvorova A. *Nucleic Acids Therapeutics*, 2024, 34(2), 52–72.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГЗ ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

Синтетические РНК в регуляции пролиферации, миграции и инвазии клеток увеальной меланомы человека

Коваль О.А.^{1,2}, Жильникова М.В.^{1,2}, Зверева С.П.¹, Бирюков М.М.^{1,2},
Атаманов В.В.^{1,3}, Мещанинова М.И.¹

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

² Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия

³ ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова»
Минздрава России, Новосибирский филиал

Увеальная меланома (УМ) является наиболее распространенным первичным внутриглазным новообразованием у взрослых. Метастазирование клеток УМ происходит гематогенным путем через периферические кровеносные сосуды, а не через регионарные лимфатические узлы, поэтому ангиогенез является отличительной чертой прогрессии и инвазии УМ. Эндотелиальный фактор роста сосудов VEGF-A секретируется опухолевыми клетками и стимулирует ангиогенез, повышая сосудистую проницаемость эндотелиальных клеток, активацию моноцитов и хемотаксис, а в случае УМ играет решающую роль в инициации отдаленных метастазов. Экспрессия VEGF-A клетками УМ в основном контролируется гипоксией и включает путь HIF1 α , мишенью которого также являются гены эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1 и Twist1. Существует предположение, что ZEB1 выступает основным эпигенетическим онкогенным фактором, необходимым для прогрессии УМ, поэтому может быть потенциальной терапевтической мишенью для ее лечения.

В данной работе мы впервые использовали комплексный подход для ингибирования пролиферации и метастазирования клеток УМ с учетом генов эпителиально-мезенхимального перехода и рецептора VEGF. Для исследования роли ZEB1 в прогрессии УМ применяли синтетические siРНК, направленные на ZEB1 и TWIST1, в том числе в комбинации с анти-VEGF препаратами, на моделях клеток персональных культур УМ человека. Дополнительно для регуляции ZEB1 была использована микроРНК miR-34a. Получены данные о пролиферации, миграции и инвазии клеток УМ, культивируемых в режиме импульсной гипоксии, в условиях нокдауна гена ZEB1 и в присутствии miR-34a.

Исследование было поддержано грантами РНФ № 23-14-00285.

Валидация азид-алкинового циклоприсоединения для синтеза молекулярных конструкций на основе олигонуклеотидов с низкомолекулярными транспортными лигандами по гетерофазному протоколу

Малова Е. А.¹, Протазанова О. С.^{1,2}, Мещанинова М. И.¹

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

² Новосибирский государственный университет, факультет естественных наук,
Новосибирск, Россия

Применение олигонуклеотидов в качестве терапевтических препаратов осложнено проблемой адресной доставки получаемых молекул до органа-мишени, что, в свою очередь, увеличивает интерес к поиску новых и усовершенствованию существующих подходов к синтезу конъюгатов олигонуклеотидов с молекулами, обеспечивающими направленную доставку. Широко используемая реакция медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC) обеспечивает высокую эффективность конъюгирования молекул различной природы и характеризуется региоселективностью.

Использование гетерофазного варианта CuAAC обладает значимыми преимуществами перед гомофазным взаимодействием: возможность использования химически синтезированных биополимеров, в частности олигонуклеотидов, сразу после автоматического синтеза без предварительного отщепления от твердого носителя; проведение нескольких последовательных циклов CuAAC для увеличения конверсии; удаление непрореагировавших компонент реакционной смеси, в частности, ионов меди и органических азидов промывкой соответствующим растворителем; возрастание практического интереса общества к аналитическим устройствам, использующим иммобилизованные на поверхности детектора биологические молекулы [1, 2] ω- poly(ethylene glycol).

В представленной работе проведено сравнение эффективности различных условий гетерофазной реакции CuAAC между модельными гомотимидилатами и ДНК/РНК, содержащими концевую алкинильную группу, и органическими азидами с заместителями различной длины и разветвленности углеводородного скелета.

1. Farzan V. M. *Automated solid-phase click synthesis of oligonucleotide conjugates: From small molecules to diverse N-acetylgalactosamine clusters* // *Bioconjugate Chemistry*. 2017. Vol. 28. P. 2599-2607.
2. Sun X. L. *Carbohydrate and protein immobilization onto solid surfaces by sequential diels-alder and azide-alkyne cycloadditions* // *Bioconjugate chemistry*. 2006. Vol. 17. P. 52-57.

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

Изоалантолактон и 18βН-глицирретовая кислота как перспективные платформы для создания лекарственных кандидатов для терапии мультиформной глиобластомы

Марков А.В.¹, Одаренко К.В.¹, Кичкина Д.О.¹, Сенькова А.В.¹, Саломатина О.В.^{1,2},
Патрушев С.С.², Шульц Э.Э.², Салахутдинов Н.Ф.², Зенкова М.А.¹

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

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

Мультиформная глиобластома (МГБ) представляет собой высоко злокачественное онкологическое заболевание с крайне низкими показателями продолжительности жизни пациентов (15-18 месяцев). Несмотря на успехи в области создания селективных противоопухолевых агентов, онкохирургии и радиотерапии, 2-х летняя выживаемость пациентов с МГБ после лечения не превышает 15% из-за способности клеток МГБ к глиально-мезенхимальному переходу (ГМП), способствующему диффузному росту опухолевых клеток, усилению их клоногенности и развитию лекарственной устойчивости.

Нами был оценен фармакологический потенциал трех серий химических производных изоалантолактона (ИАЛ) и 18βН-глицирретовой кислоты (ГЛК) в отношении ключевых процессов, связанных с ГМП и патогенезом МГБ. В результате *in vitro* скрининга производных ИАЛ было выявлено соединение rat651, потенциально способное проникать через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) и эффективно ингибирующее клоногенность, адгезивность, подвижность и инвазивность клеток глиобластомы U87. В комбинации с темозоломидом rat651 проявлял выраженный синергический эффект в отношении жизнеспособности клеток МГБ. В результате *in silico* анализа было показано, что выявленные эффекты rat651 могут быть опосредованы его прямым взаимодействием с белком теплового шока Hsp90α.

В случае производных ГЛК, выявлено два соединения, вызывающих интерес в области терапии опухолей ЦНС. (1) Солоксолон триптаид (СТА), способный накапливаться в тканях головного мозга мышей, вызывал ROS-зависимую гибель клеток U87 в результате митохондриального апоптоза и блокировал ряд ключевых характеристик агрессивного фенотипа МГБ, включая подвижность, сфероидный и клоногенный рост. Кроме этого, СТА обладал синергичностью в комбинации с темозоломидом в отношении клеток МГБ, а на модели клеток нейробластомы был показан его нейропротекторный потенциал. (2) Солоксолон метил (СМ) эффективно ингибировал стимулирующий эффект лептина на агрессивность клеток нейробластомы Neuro-2a, блокируя пролиферацию лептин-активированных клеток и усиливая их адгезивность к внеклеточному матриксу в результате иррегуляции ZO-1 и виментина. С помощью методов сетевой фармакологии установлено, что наблюдаемые эффекты СТА и СМ могут быть связаны с их прямым взаимодействием с EGFR и SOS/MEK1/ERK2 соответственно.

Исследование поддержано грантом РНФ №23-14-00374.

Исследование биологической активности и механизма действия анти-миРНК мезильных олигонуклеотидов на линиях клеток колоректального рака мыши и человека

Мирошниченко С. К.¹, Патутина О. А.¹, Купрюшкин М. С.¹, Марков А. В.¹,
Маслов М. А.², Зенкова М. А.¹

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

² Российский технологический университет (РТУ МИРЭА), Москва, Россия

Колоректальный рак (КРК), согласно данным ВОЗ, занимает второе место среди причин смертности от рака, и требует разработки высокоэффективных консервативных протоколов лечения. Многочисленные исследования молекулярных основ КРК указывают на критическую роль некодирующих РНК, в частности, микроРНК (миРНК) в инициации и развитии данного заболевания. В этой связи, исследование эффективности соединений, ингибирующих функциональную активность про-онкогенных миРНК в клетках КРК представляется актуальным и перспективным.

Ранее нашей группой на опухолевых моделях различного гистогенеза были продемонстрированы высокий анти-пролиферативный, анти-миграционный, про-апоптотический и противоопухолевый потенциалы миРНК-направленных олигонуклеотидов, содержащих N-метансульфонилфосфорамидную (μ -) модификацию.

В данном исследовании разработанные нами антисмысловые олигонуклеотиды (ASO) были впервые применены на клетках колоректального рака мыши СТ-26 и человека Сасо-2. Проведен анализ биологического действия разработанных μ -ASO соединений и определены концентрационные и кинетические параметры накопления μ -ASO в клетках в зависимости от скорости роста клеток и степени подавления в клетках миРНК-мишеней.

При анализе изменений протеома клеток Сасо-2 под действием μ -ASO обнаружены пулы up и down-регулируемых белков, проведена их функциональная аннотация и выявлены ключевые сигнальные пути и белковые мишени, изменение экспрессии которых происходит вследствие подавления определенных миРНК.

Полученные данные позволяют предложить схему введения миРНК-направленных μ -ASO *in vivo* и дают представление о механизме действия μ -ASO в клетках колоректального рака.

Исследование было поддержано грантом РФФ №19-74-30011.

Поиск новых маркерных генов лекарственной устойчивости опухолевых клеток и разработка терапевтических кандидатов для ее терапии

Моралев А.Д.¹, Саломатина О.В.^{1,2}, Салахутдинов Н.Ф.², Зенкова М.А.¹, Марков А.В.¹

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

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

В настоящее время развитие множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) опухолевых клеток остается одной из нерешенных проблем в химиотерапии онкологических заболеваний. Накоплено большое количество данных о механизмах формирования данного фенотипа клеток, однако до сих пор нет полного понимания регулома, контролирующего развитие МЛУ. Также, на фармакологическом рынке отсутствуют одобренные для терапии селективные ингибиторы эффлюксных транспортеров как одних из ключевых эффекторов развития МЛУ, среди которых наиболее изученным является Р-гликопротеин (Р-гр). Ранее нашей группой были синтезированы и изучены амиды солоксолон (производного 18βН-глицирретовой кислоты), которые обладали выраженным противоопухолевым потенциалом и способностью проникать через гематоэнцефалический барьер. Целью настоящего исследования стало (1) выявление новых маркерных генов, ассоциированных с резистентностью опухолевых клеток к доксорубину (DOX), и (2) оценка способности 8 амидов солоксолон ингибировать Р-гр-опосредованный эффлюкс в опухолевых клетках с МЛУ.

Для выявления маркерных генов, ассоциированных с МЛУ, был проведен комплексный биоинформатический анализ (выявление дифференциально экспрессируемых генов в DOX-резистентных опухолевых клетках на основе ре-анализа данных кДНК микропипирования, их функциональная аннотация, построение и анализ генных сетей, поиск корреляции с выживаемостью онкобольных). В результате были выявлены известные (*ABCB1* (кодирует Р-гр), *CCND1*) и новые (*SEH1L*, *GJA1*, *TUBA4A*, *PLCB1*, *TCF3*, *ZYX*, *ABAT*, *EIF5*, *PGK1*) МЛУ-ассоциированные маркерные гены, которые дополнительно были верифицированы с помощью методов компьютерной биологии. Вторая часть исследования была посвящена поиску низкомолекулярных ингибиторов Р-гр из библиотеки амидов солоксолон. Было показано, что N,N-диметиламин-содержащее соединение **sg-650** способно напрямую связываться с трансмембранным доменом Р-гр и эффективно ингибировать его транспортную функцию в нетоксичной концентрации, что приводило к синергическому усилению цитотоксичности DOX в отношении опухолевых клеток с фенотипом МЛУ при комбинированном использовании.

Таким образом, полученные данные расширяют наши представления о регуломе, контролирующем развитие МЛУ и предоставляют новые потенциальные мишени для таргетной терапии таких опухолей, а также указывают на высокий потенциал использования тритерпеноидов в качестве перспективной платформы для разработки новых селективных ингибиторов Р-гр.

Исследование поддержано грантами РНФ № 19-74-30011 (поиск маркерных генов МЛУ), РНФ № 23-14-00374 (исследование анти-Р-гр активности sg-650)

Исследование свойств N-бензимидазольных производных олигодезоксирибонуклеотидов

Морозова Ф. В.^{1,2}, Голышев В. М.^{1,2}, Ломзов А. А.^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Олигонуклеотиды – короткие синтетические фрагменты нуклеиновых кислот (НК), которые широко применяются во множестве научных и прикладных задач и исследований. Свойства олигонуклеотидов могут быть направленно изменены, а области их применения расширены, если ввести химические модификации в их структуру.

Совсем недавно в ИХБФМ СО РАН разработан и впервые синтезирован новый класс аналогов НК – олигонуклеотиды, имеющие бензоазольные модификации фосфатных групп (ФАО). Такие модификации могут быть введены в структуру олигонуклеотида в рамках автоматического твердофазного фосфитамидного синтеза. На данный момент уже получены первые сведения о физико-химических свойствах ФАО [1] и возможности их применения в качестве праймеров в ПЦР [2]. В данной работе были исследованы свойства комплексов ДНК с ФАО, не только для комплементарных комплексов, содержащих одиночные нуклеотидные несоответствия (мисматчи).

Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала определены термодинамические эффекты, связанные с введением модификации в несовершенные комплексы, а так же связанные с влиянием сорастворителей, как для совершенных, так и несовершенных комплексов. Методом спектроскопии кругового дихроизма исследовано влияние нуклеотидных несоответствий, паттерна модификаций и наличия сорастворителей на вторичную структуру изучаемых комплексов.

Была исследована скорость и эффективность элонгации тринадцатизвенных ФАО праймеров в комплексе с 22-звенной ДНК-матрицей как для систем с мисматчами, так и комплементарных комплексов при процессировании их ДНК-зависимой ДНК-полимеразой. Анализ продуктов удлинения ФАО-праймеров Taq ДНК-полимеразой позволил определить важные для действия фермента положения ФА-групп в праймере замедляющие или препятствующие удлинению олигомера. В частности, модификация первого межнуклеотидного фосфатного остатка с 3'-конца праймера приводила к заметному снижению эффективности его удлинения, в то время как модификация второго фосфата в меньшей степени ингибировала процесс элонгации как для комплементарных комплексов, так и комплексов с мисматчем.

1. *Properties of phosphoramidate benzoazole oligonucleotides (PABAOs). I. Structure and hybridization efficiency of N-benzimidazole derivatives / V. M. Golyshev, I. I. Yushin, O. A. Gulyaeva [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2024. – Vol. 693. – P. 149390.*
2. *Phosphoramidate Azole Oligonucleotides for Single Nucleotide Polymorphism Detection by PCR / A. S. Chubarov, E. E. Baranovskaya, I. P. Oscorbin [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – № 1. – P. 617.*

Исследование было поддержано грантом РФФ № 23-74-01116.

Синтез и физико-химические свойства новых фосфорамидных олигонуклеотидов

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

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

Природные и модифицированные олигонуклеотиды получили широкое применение в диагностике и терапии. Значительное число модифицированных аналогов олигонуклеотидов составляют соединения с модифицированной межнуклеотидной фосфатной группой, например, олигодезоксинуклеотиды с тιοфосфатными группами, которые повышают устойчивость к нуклеазам, что способствует пролонгации действия терапевтических препаратов на их основе. Недавно разработанные фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО) успешно показали себя в исследованиях, направленных на создание терапевтических агентов и систем молекулярной диагностики. Предложенные нами новые производные олигодезоксирибонуклеотидов с бензоазольными модификациями (ФАО) показали хорошие результаты при использовании в качестве праймеров в аллель-специфической ПЦР для выявления точечных мутаций в ДНК.

Одним из способов введения модификаций по межнуклеотидному фосфату является реакция Штаудингера. В ходе синтеза олигонуклеотида 3'-концевой амидофосфит реагирует с органическим азидом в присутствии активатора. Продуктом реакции является фосфатный остаток с имидо-модификацией. Данную реакцию можно проводить как вручную, так и в рамках автоматического твердофазного фосфитамидного синтеза, вместо стадии окисления. Таким способом были получены ФГО и ФАО.

В данной работе были получены новые фосфорамидные олигонуклеотиды, содержащие кофеиновую, нафтоимидазольную а также тетрафторпиридиновую модификации и исследованы их физико-химические свойства. Для этого предварительно были синтезированы соответствующие азиды-модификаторы, оценена их способность реагировать с трехвалентным фосфором на модельных соединениях. Новые олигонуклеотидные аналоги были получены в полуавтоматическом режиме синтеза. Модификации вводили по межнуклеозидным фосфатам на 3'-, 5'-конце или в середине гексатимидилатной цепи и декамеров гетеронуклеотидного состава. Введенные модификации были стабильны в процессе синтеза и при последующей очистке.

Полученные олигонуклеотиды исследованы методом оптической спектроскопии при различных pH, что позволило определить pKa модифицированных фосфатных остатков. Исследование флуоресцентных свойств олигонуклеотидов показало, что нафтоимидазольное производное, независимо от положения модификации имеет достаточно интенсивную эмиссию флуоресценции в области 350-400 нм. Определены термодинамические параметры формирования дуплексов аналогами олигонуклеотидов с ДНК и РНК, такие как ΔH° , ΔG° , ΔS° , и температура плавления. Установлено, что новые модификации практически не влияют на термодинамическую стабильность таких комплексов. Полученные результаты указывают на перспективность новых производных нуклеиновых кислот и возможность варьирования заместителей для решения практических задач.

Исследование поддержано грантом РНФ № 23-14-00358.

Перепрофилирование лекарственных препаратов для ингибирования мезенхимального перехода глиобластомы

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

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины,
Новосибирск, Россия

Разработка лекарственных препаратов *de novo* – дорогостоящий и трудоемкий процесс с низкой вероятностью успеха. В этом отношении перепрофилирование – поиск противоопухолевой активности у соединений, одобренных для лечения других заболеваний – имеет большие перспективы из-за снижения затрат на доклинические испытания, оценку безопасности и разработку рецептуры.

Целью данного исследования было нахождения перспективных анти-глиобластомных агентов с помощью перепрофилирования. Мишенью соединений был выбран процесс глиально-мезенхимального перехода (ГМП), регулирующий инвазию опухолевых клеток. На первом этапе был проведен ре-анализ данных полногеномного РНК-секвенирования опухолей пациентов (TCGA-GBM) и клеток глиобластомы (GSE192710): с помощью анализа взвешенных сетей коэкспрессии генов (WGCNA), анализа вариабельности наборов генов (GSVA) и анализа дифференциальной экспрессии были установлены 160 генов, совместно экспрессирующихся в опухолях и коррелирующих с ГМП. Данные гены были использованы для построения сети белок-белковых взаимодействий, в которой на основании 6 критериев центральности (MCC, Degree, MNC, EPC, Closeness и Radiality) было выявлено 30 хаб-генов, играющих важную роль в регуляции ГМП. С использованием ресурса Connectivity Map, содержащего информацию о влиянии биоактивных молекул на транскриптом опухолевых клеток, были идентифицированы 120 соединений, ингибирующих экспрессию хаб-генов. Согласно анализу *in silico* с использованием хемоинформатических платформ PreADMET, AlzPlatform, ADMETlab, SwissADME и LiverTox, 5 соединений, включая SP600125, дибензоилметан, FG-7142, вемурафениб и фенсуксимид, являются перспективными ингибиторами ГМП, поскольку они способны проникать через гематоэнцефалический барьер и не являются субстратами для Р-гликопротеина.

ГМП-ингибирующая активность SP600125 была верифицирована *in vitro*. SP600125 вызывал дозозависимое снижение жизнеспособности и способности к формированию колоний в клетках глиобластомы U87 и U118. При использовании в нетоксичных концентрациях SP600125 подавлял миграцию клеток U87 и усиливал их адгезию к культуральному пластику. Кроме того, SP600125 ингибировал изменение морфологии в ходе ГМП, индуцированного трансформирующим ростовым фактором бета 1 (TGF- β 1) или миметиком гипоксии хлоридом кобальта (CoCl₂). Предобработка клеток U87 SP600125 (20 μ M) в течение 30 минут подавляла transwell-миграцию и экспрессию мезенхимальных маркеров на уровне мРНК (fibronectin, Slug) и белка (N-cadherin) в TGF- β 1-индуцированных клетках U87.

Таким образом, нами выявлен перспективный ингибитор ГМП SP600125, который может быть использован для подавления агрессивного фенотипа глиобластомы и увеличения эффективности конвенциональной терапии.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 23-14-00374.

Олигонуклеотиды с ненуклеотидными додецил-содержащими звеньями и сывороточный альбумин как потенциальные составляющие гибридных наноконструкций

Павлова А. С., Купрюшкин М. С., Пышная И. А., Пышный Д. В.

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

Гибридные наноконструкции на основе природных биополимеров, таких как белков и нуклеиновых кислот, и различных типов биологически активных соединений в своем составе являются потенциально перспективными для применения в персонализированной медицине и тераностике. В настоящее время разработки в этой области направлены на получение и исследование гибридных наноконструкций и их составляющих с целью улучшения контролируемого высвобождения терапевтических средств, стабильности и фармакокинетических характеристик терапевтических агентов, их направленной доставки, а также биологической совместимости и минимизации иммунного ответа организма.

Нами были получены данные о белково-нуклеиновых взаимодействиях додецил-содержащих олигонуклеотидов (ДСО) и сывороточного альбумина человека (ЧСА), свидетельствующие о высоком потенциале их использования в качестве составляющих гибридных наноконструкций [1-2]. В данной работе будут представлены результаты изучения связывания ДСО с альбумином методами микроскопического термофореза, задержки в геле и атомно-силовой микроскопии.

В зависимости от цели своего применения гибридные наноконструкции могут быть модифицированы в дальнейшем моноклональными антителами, аптамерами, пептидами, лигандами, обладающими сродством к нужным мишеням (фолиевая кислота), а также их различными комбинациями [3].

1. Pavlova A. S., Dovydenko I. S., Kupryushkin M. S., Grigor'eva A. E., Pyshnaya I. A., and Pyshnyi D. V. Amphiphilic "Like-a-Brush" Oligonucleotide Conjugates with Three Dodecyl Chains: Self-Assembly Features of Novel Scaffold Compounds for Nucleic Acids Delivery // *Nanomaterials*. - 2020. - V. 10. - 1948.
2. Pavlova A. S., Ilyushchenko V. V., Kupryushkin M. S., Zharkov T. D., Dyudeeva E. S., Bauer I. A., Chubarov A. S., Pyshnyi D. V., Pyshnaya I. A. Complexes and Supramolecular Associates of Dodecyl-Containing Oligonucleotides with Serum Albumin // *Biochemistry (Moscow)*. - 2023. - V. 88. - P. 1165-1180.
3. Thelu H. V. P., Atchimnaidu S., Perumal D., Harikrishnan K. S., Vijayan S., Varghese R. Self-Assembly of an Aptamer-Decorated, DNA-Protein Hybrid Nanogel: A Biocompatible Nanocarrier for Targeted Cancer Therapy // *ACS Appl. Bio Mater.* - 2019. - V. 2. - P. 5227-5234.

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

Нанотранспортёры нуклеиновых кислот и малых лекарственных молекул на основе карбоната кальция

Попова В. К., Дмитриенко Е.В.

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

Развитие методологической и приборной базы позволило получать и тестировать наноматериалы, сопоставимые по размерам с клеточным уровнем жизни. Такие наноразмерные объекты нашли широкое применение в области биомедицины, особенно в качестве носителей биологически активных соединений (БАС). Одна из ключевых ролей наноматериалов *in vivo* – сохранение и увеличение физиологического эффекта БАС на организм пациента, путем придания физиологической устойчивости агенту и изменения его физико-химических, а также фармакологических свойств. Первостепенными кандидатами на разработку системы доставки являются высокотоксичные лекарства, а также терапевтические нуклеиновые кислоты (НК).

В работе предложен многообещающий подход увеличения физиологической стабильности НК и избирательного высвобождения противоракового агента (доксорубина, DOX) за счет включения БАС в состав комплекса с нанокompозитными частицами карбоната кальция (СаНЧ).

На первом этапе разработан способ получения стабильной суспензии сферических частиц карбоната кальция размером 200 нм (СаНЧ). Создание наногбрида СаНЧ с материалом, обладающим магнитными свойствами, обеспечило направленность транспортёру (Fe@СаНЧ). Для двух типов материалов показана стабильность в водных растворах и условиях близких к физиологическим, а также отсутствие токсичности в рабочем диапазоне концентраций. Более того, материалы характеризуются высокой ёмкостью к DOX: 660 и 1900 мкг лекарства на мг частиц для СаНЧ и Fe@СаНЧ соответственно. Клеточные эксперименты доказали большую эффективность применения нанокompозитов карбоната кальция в качестве носителей доксорубина, в том числе с регистрацией положительного действия пролонгированного высвобождения DOX из состава нанокompозита, в сравнении с индивидуальным лекарством.

Более того, нанокompозиты карбоната кальция продемонстрировали высокую ёмкость по отношению к модельным НК вплоть до 80 наномоль ОН на мг СаНЧ. Данные цитометрии доказывают терапевтическую эффективность стратегии. Однако, результаты действия DNaseI на комплекс СаНЧ с DOX показали, что ни путь сорбции, ни инкапсуляции ОН не позволяют обеспечить его нуклеазную устойчивость. Поэтому, в работе предложены варианты введения модификаций в последовательность терапевтического ОН, для обеспечения его ферментативной устойчивости.

Таким образом, в работе предложены стратегии увеличения терапевтического действия малых лекарственных молекул и нуклеиновых кислот, путем их включения в состав нанокompозитов карбоната кальция.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 24-24-20105, <https://rscf.ru/project/24-24-20105/>) в рамках проекта, поддержанного Правительством Новосибирской области (соглашение № р-97).

Влияние внеклеточной ДНК клеток опухоли и опухолевого окружения на рост меланомы B16 *in vitro* и *in vivo*

Филатова А. А.^{1,2}, Алексеева Л. А.¹, Савин И. А.¹, Сенькова А. В.¹, Миронова Н. Л.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

В течение длительного времени главенствовала гипотеза, что большая часть внеклеточной ДНК (внДНК), циркулирующей в кровотоке организма-опухоленосителя, происходит из опухолевых клеток. внДНК появляется в кровотоке в результате высвобождения геномной ДНК вследствие разрушения клеток посредством апоптоза или некроза. Помимо опухолевых клеток, в состав внДНК вносят вклад клетки из опухолевого микроокружения - опухоль-ассоциированные фибробласты (CAF), нейтрофилы (TAN) и макрофаги (TAM).

В нашей работе было исследовано влияние внДНК, полученной из кондиционированной среды клеток меланомы мыши B16 (B16-внДНК), и внДНК фибробластов, полученной из кондиционированной среды клеток мыши L929 (L929-внДНК), на клетки B16 *in vitro* и *in vivo*.

In vitro при инкубации клеток B16 в присутствии внДНК (1000 нг/мл) наблюдались различные биологические эффекты в зависимости от источника внДНК: в ответ на присутствие B16-внДНК снижалась миграция и пролиферация клеток меланомы B16, а также увеличивался процент клеток в состоянии апоптоза. L929-внДНК наоборот индуцировала увеличение пролиферации и миграции опухолевых клеток согласно данным МТТ-теста и миграционного анализа.

Для исследования влияния внДНК *in vivo* клетки B16 инкубировали в присутствии внДНК (100 нг/мл) и вводили мышам C57Bl подковожно для развития первичного опухолевого узла (модель I) или внутривенно для формирования метастазов в легких (модель II). Клетки B16, обработанные L929-внДНК, характеризовались более высокой скоростью роста опухолевого узла в случае модели I и увеличением количества метастазов в модели II. Обработка клеток B16 B16-внДНК приводила к уменьшению опухолевого узла и количества метастазов в моделях I и II, соответственно. Анализ состава внДНК показал, что в составе B16-внДНК высоко представлены фрагменты мобильных генетических элементов (МГЭ) (B1, L1) и онкогенов (Myc, Ras). В составе L929-внДНК были выявлены последовательности МГЭ, чья представленность была сравнимой с опухолевой внДНК (L1), и онкоген Myc, количество копий которого в составе L929-внДНК оказалась выше, чем в опухолевой B16-внДНК. Анализ присутствия митохондриальной ДНК в составе внДНК выявил последовательности мтДНК только в B16-внДНК, тогда как L929-внДНК их не содержала. Анализ уровней метилирования внДНК показал, что опухолевая B16-внДНК гипометилирована по сравнению с L929-внДНК. Полученные данные указывают на возможное участие ДНК фибробластов микроокружения опухоли в опухолевой прогрессии и, потенциально, в формировании новых опухолевых очагов за счет трансформации нормальных клеток.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 22-14-00289.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Awad M. S. 79

М

Markov O. V. 79

З

Zenkova M. A. 79

А

Аврамчук Т. В. 37

Ажикина Т. Л. 56

Алексеева И. В. 34

Алексеева Л. А. 105

Амирлоо Б. 73

Анарбаев Р. О. 29

Антипова О. М. 57, 69

Антропов Д.Н. 80

Аралов А. В. 56, 58, 65

Атаманов В. В. 95

Атрошенко Д.Л. 14

Б

Бабайлова Е. С. 15

Бакман А. С. 34

Баранова С. В. 35, 40, 43

Барановская Е. Е. 81

Бардашева А. В. 88

Бардашева А.С. 27

Барматов А. Е. 19

Бауэр И. А. 46, 82

Бахно И. А. 40

Бачкова И. К. 75, 83

Бережнев Е. А. 16

Бирюков М. М. 36, 95

Биченкова Е. 73

Бишани А. 75

Брылев В. А. 56, 59

Булгакова А. Е. 62, 84

Булыгин К. Н. 15

Бунева В. Н. 92

Бутенко И. О. 26

Быченко О. С. 56

В

Валяев А. В. 94

Ван М. 37

Варижук А. М. 58, 65

Васильева С. В. 81, 85, 101

Власов В. В. 73

Воробьева М. А. 60, 61

Воронин А.А. 38

Г

Гарафутдинов Р. Р. 17

Гасанов Н.Б. 47

Гладких Д. В. 80

Говорун В. М. 26

Годовикова Т. С. 37

Голанов А. В. 71

Головин А. В. 59, 71

Головина Д.И. 14

Голышев В. М. 80, 100

Гопаненко А. В. 15

Горбунова Е. А. 86, 91

Горленко Е. С. 70, 87

Грайфер Д. М. 15

Григорьева А. Е. 27

Грин И. Р. 25

Гуляк Е. Л. 59

Гусева Е. А. 58

Д

Давлетгильдеева А. Т. 34, 39

Давыдова А.С. 61

Данилин Н.А. 88

Джао М. 39

Дзариева Ф. М. 57

Дмитриенко Е. В. 62, 82, 84, 104

Довыденко И. С. 40

Должикова О. А. 70, 89

Доме А. С. 80

Донцова О.А. 26

Дреничев М. С. 31

Дымова М. А. 37

Дырхеева Н. С. 18, 31, 52

Дюдеева Е. С. 90

Е

Ендуткин А. В. 19

Епанчинцева А. В. 40, 86, 91

Ермаков Е. А. 92

Есенина А. А. 64, 93

Ж

Жарков Д. О. 19, 20, 25, 51

Жарков Т. Д. 52, 82, 94

Жгун А. А. 30

Жильникова М. В. 95

Жуков С. А. 52, 82, 83

Журавлев Е. С. 80

Журавлева Ю. С. 42

З

Завьялова Е. Г. 58, 63

Задворных Д. А. 27, 46

Закиян С.М. 18, 52
Закревский Д. Э. 36
Затеева М.В. 51
Захаренко А. Л. 18, 31
Захарова О. Д. 37
Зверева С. П. 95
Зенкова М. А. 75, 97, 98, 99, 102
Зиновьева Д. В. 43
Золотёнкова Е. А. 15

И

Иванов Б. М. 57
Ильина Е. С. 52
Иматдинов А.Р. 47
Иматдинов И.Р. 47

К

Кабилов М. Р. 15, 62, 84
Каневская А. А. 21
Карабельский А.В. 47
Ким Д. В. 19
Кириллова Ю. Г. 64, 93
Кичкина Д. О. 97
Кладова О. А. 34
Кляус Н. А. 92
Книжник Е. К. 65
Коваль В.В. 35
Коваль О. А. 36, 95
Козловская Л. И. 58
Колесникова В. А. 71
Колоколов М. И. 74
Комарова Н. В. 66
Коньков В. В. 92
Копылов А. М. 57, 59, 69, 71
Корниенко Т. Е. 31
Королев М. А. 61
Королева Л.С. 27
Коршун В. А. 59, 71
Корягина М. С. 26
Красицкая В. В. 67
Крумкачева О. А. 74
Крячкова Н. В. 36
Кузнецов А. Е. 66
Кузнецов Н. А. 22, 25, 28, 34, 39, 48, 50
Кузнецова А. А. 23, 25, 28, 39
Кукушкин В.И. 63
Кульбачинский А. В. 21
Кунова М.С. 44
Купрюшкин М. С. 52, 62, 75, 82, 83, 94, 98, 103

Кутузов М. М. 29

Л

Лаврик О. И. 16, 24, 29, 31, 52
Липенский М.М. 41
Ломзов А. А. 62, 81, 85, 100, 101
Лузянин Т. А. 64
Лукьяненко А. В. 67
Ляпин П. К. 90

М

Макарова Д. М. 80
Малахова А. 18
Малова Е. А. 96
Малыгин А. А. 15
Мальцева Е. А. 29
Марков А. В. 97, 98, 99, 102
Марков О. В. 80
Мартини Б. А. 56
Марьясина С. С. 30
Маслов М. А. 41, 80, 98
Матвеев А. Л. 88
Матвеева А. М. 80
Матюшкина Д. С. 26
Медведев С. П. 52
Меламуд М. М. 92
Мещанинова М. И. 68, 70, 75, 89, 95, 96
Милахина Е. В. 36
Минская Е.С. 47
Миронова Н. Л. 73, 105
Мирошниченко С. К. 73, 98
Митин Д. Е. 45
Михайленко К. И. 17
Моисеенко В. Л. 57, 69
Моралев А. Д. 99
Мороз В.Д. 47
Морозова Е. П. 67
Морозова Н.Г. 41
Морозова О. Б. 42, 49
Морозова Ф. В. 100
Мушенков В.А. 63

Н

Науменко К.Н. 16, 24
Невинский Г. А. 92
Нечаев А.Н. 63
Новгородцева А. И. 85, 101
Новикова Т. С. 92
Новопашина Д. С. 25, 70, 87, 88, 89

О

Одаренко К. В. 97, 102
Окорокова Л. 18

Олейник Г.А. 43
Оскорбин И.П. 38, 44
Очкасова А. С. 15

П

Павлова А. С. 103
Павлова Г. В. 57, 59, 69, 71
Павлова С. А. 69, 71
Павлова Ю. И. 65
Патрушев С. С. 97
Патутина О. А. 73, 98
Пермякова Н. В. 25
Петров К. Д. 45
Петрова Д. В. 25
Полетаева Ю. Е. 40
Польшаков В. И. 30
Полякова А. А. 36
Попова В. К. 104
Пронин И. Н. 57, 59, 71
Протазанова О. С. 96
Прохоров И. А. 64, 93
Пучков П. А. 80
Пышная И. А. 103
Пышный Д. В. 62, 103

Р

Рогалева В. И. 37
Рубцова М. П. 26
Руденко А. Ю. 30
Рябова Е. С. 27, 46
Рябчикова Е. И. 27, 40, 46
Ряполова А.В. 47

С

Савин И. А. 105
Савченко Е. А. 57
Саковина Л. В. 70, 87
Салахутдинов Н. Ф. 97, 99
Салина Е.Г. 56
Саломатина О. В. 97, 99
Самойленкова Н. С. 57
Санникова Н. Э. 74
Сапожникова К. А. 59
Сахабутдинова А. Р. 17
Светлова Ю. И. 65
Сенчурова С. И. 28
Сенькова А. В. 73, 97, 105
Сергеев Е.П. 14
Сизиков А. Э. 92
Сильников В. Н. 27, 37, 46
Скворцова Ю. В. 56

Степанов Г. А. 62, 80
Суханова М. В. 24, 29

Т

Тупикин А. Е. 15
Тупицына А.В. 27
Тюгашев Т. Е. 28, 39, 48, 50

У

Укладов Е.О. 48
Усачев Д. Ю. 71

Ф

Фаб Л.В. 69
Филатова А. А. 105
Филипенко М.Л. 38, 44
Филонов В. Л. 30
Фишман Н. Н. 42, 49
Франк Л. А. 67

Х

Хейман Т. 73
Хлынова Т. А. 74
Ходырева С. Н. 52
Хомутов А. Р. 30
Хомутов М. А. 30

Ч

Чемерис А. В. 17
Черников И. В. 75, 83
Черноловская Е. Л. 75, 83
Черноносков А. А. 35
Чернышова И. А. 31
Чжао М. 50
Чиглинцева Д. А. 73
Чумаков С. П. 65
Чуприкова М. С. 51

Ш

Шамонова М. А. 26
Шанидзе Л. В. 67
Швейгерт И. В. 36
Шендер В. О. 26
Шляпина В. Л. 26
Шмендель Е. В. 80
Штокало Д. 18
Шульц Э. Э. 97

Ю

Юдкина А. В. 19, 51
Юрковская А. В. 42, 49

Я

Яковлев А.О. 19, 51
Ямских А.А. 52

СОДЕРЖАНИЕ

ФУНКЦИИ БЕЛКОВ В ПРОЦЕССАХ ПЕРЕНОСА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ И ОБЕСПЕЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА	11
Устные доклады	13
Постерные доклады	33
СИНТЕТИЧЕСКИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ	53
Устные доклады	55
Постерные доклады	77
Авторский указатель	107

Подписано в печать 01.07.2024. Формат 70×100/16.
Усл. печ. л. 7. Тираж 100 экз. Заказ № 880.

Отпечатано в типографии ООО “Офсет-ТМ”
Новосибирск, ул. Терешковой, 29, офис 106.
тел. (383)304-82-32, e-mail: ofsetn@yandex.ru