

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской академии наук
(ТИБОХ ДВО РАН)

ХVIII ВСЕРОССИЙСКАЯ МОЛОДЁЖНАЯ
ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ ПО АКТУАЛЬНЫМ ПРОБЛЕМАМ
ХИМИИ И БИОЛОГИИ

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ



6-13 сентября 2021 г.

Владивосток



MERCK

УДК 577

ББК 28.07

XVIII Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, ТИБОХ ДВО РАН. Материалы конференции / Владивосток, 6 - 13 сентября 2021. – Владивосток.

В сборнике представлены тезисы пленарных докладов ведущих ученых, а также устных и стендовых докладов студентов, аспирантов и молодых специалистов, участников XVIII Всероссийской молодежной школы-конференции. В рефератах отражены результаты научных работ по приоритетным направлениям химии, биологии, прикладной биологии и медицины. Для студентов, аспирантов, научных сотрудников и специалистов в области химии и биологии.

DOI: 10.47471/18_2021_09_06_13_0

ISBN 978-5-91849-165-2

Организационный комитет выражает благодарность за оказанную поддержку Федеральному государственному бюджетному учреждению науки Тихоокеанскому институту биоорганической химии им. Г. Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Мероприятие проведено при финансовой поддержке компании Merck.

Председатель Оргкомитета

Дмитренко Павел Сергеевич, к.х.н., директор ТИБОХ ДВО РАН

Организационный комитет:

Белик Алексей Анатольевич, зам. председателя, м.н.с., председатель Совета молодых ученых ТИБОХ ДВО РАН

Кусайкин Михаил Игоревич, зам. директора, д.б.н., доцент

Володько Александра Викторовна, н.с., к.х.н.

Кветкина Александра Николаевна, к.х.н., м.н.с.

Фильштейн Алина Петровна, м.н.с.

Менчинская Екатерина Сергеевна, к.б.н., н.с.

Усольцева Роза Владимировна, к.х.н., с.н.с.

Гладких Ирина Николаевна, к.х.н., с.н.с.

Суриц Валерий Валерьевич, м.н.с.

Пелагеев Дмитрий Николаевич, к.х.н., н.с.

Куриленко Валерия Валерьевна, к.б.н., ученый секретарь

Председатель программного комитета:

Стоник Валентин Аронович, академик РАН, научный руководитель ТИБОХ ДВО РАН

Программный комитет:

Деев Сергей Михайлович, академик РАН

Кочетков Сергей Николаевич, академик РАН

Аминин Дмитрий Львович, член.-корр. РАН, д.б.н., заведующий лабораторией биоиспытаний и механизма действия БАВ

Ермакова Светлана Павловна, д.х.н., заведующая лабораторией химии ферментов

Калинин Владимир Иванович, д.б.н.

Новиков Вячеслав Леонидович, д.х.н.

СОДЕРЖАНИЕ

Пленарные доклады	
С. М. Деев Онкотераностика. Достижения, проблемы, перспективы	8
Д. О. Дормешкин, Н. В. Струшкевич, А. А. Гилев Методологические подходы в создании лекарств нового поколения	10
А. С. Иванов Исследование межмолекулярных взаимодействий с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR)	11
М. П. Исаева Геномные технологии в биопрспектинге морских (микро)организмов	12
И. Ю. Торопыгин Количественная масс-спектрометрия MALDI-TOF: возможности и особенности	13
В. Н. Давыдова Ранний индуцибельный ответ и его роль в защите организма от инфекции	14
Е. А. Буракова, А. А. Фокина, А. Ш. Держалова, К. В. Клабенкова, Д. Э. Патрушев, С. Н. Бизяев, Д. А. Стеценко Нуклеиновые кислоты как платформа для создания интеллектуальных лекарственных препаратов будущего	15
А. С. Барашкова Подходы к выделению и структурному анализу антимикробных пептидов растений	16
Е. А. Рогожин Разнообразие антимикробных пептидов растений и беспозвоночных	17
Л. А. Калужский, Е. О. Яблоков Цитохромы P450 как мишень для лекарственных соединений: строение и функции	18
И. Е. Кашеверов Ионные каналы нервной, мышечной и иммунной систем: от низкомолекулярных и пептидно-белковых лигандов к структуре и механизмам функционирования	19
Устные доклады	
М. А. Тюменцев, Д. Х. Юхтанов, Н. Г. Колосова Дисфункция митохондрий как предпосылка развития спорадической формы болезни Альцгеймера	21
Е. А. Рудницкая, Т. А. Козлова, А. О. Бурняшева, Н. А. Стефанова, Д. А. Пеунов, Н. Г. Колосова Задержка созревания мозга в раннем онтогенезе как возможная предпосылка развития болезни Альцгеймера	22
К. А. Айрияци, В. В. Решетников, Ю. А. Рябушкина, П. Е. Кисаретова, Н. П. Бондарь Последствия раннего постнатального стресса: изменение реакции на социальный стресс и возрастная динамика уровня тревожности	23
А. С. Меньшов, Д. В. Бердышев, А. И. Калиновский Сравнение конформации первой гликозидной связи в голотурине В и его десульфатированном аналоге в растворе и в кристалле	24
Е. П. Быстрицкая, Н. Ю. Чернышева, С. Н. Балдаев, А. В. Ракин, М. П. Исаева Влияние стрессов на трансляционную регуляцию главных поринов <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	25
Е. Ю. Букачич, А. В. Дорошков, У. С. Зубаирова Влияние топологии листа мягкой пшеницы <i>Triticum aestivum</i> на рост ростковых трубок спор бурой ржавчины <i>Puccinia triticina</i>	26
Д. В. Телегина, А. К. Антоненко Изменения глутаматэргической и ГАМКэргической систем в сетчатке крыс при старении	

и развитии ВМД-подобной ретинопатии	27
К. В. Клабенкова, Е. А. Буракова, С. Н. Бизяев, А. А. Фокина, Д. А. Стеценко Использование реакции Штаудингера для получения конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих амидную связь при модифицированной фосфатной группе	28
Т. И. Бикчурина, Е. А. Кизилова, Ф. Н. Голенищев Цитогенетические и гистологические последствия формирования гибридной стерильности у серых полевков	29
Л. П. Малиновская, П. М. Бородин, А. А. Торгашева Поведение в мейозе и наследственная передача хромосомы, специфичной для клеток зародышевого пути, у певчих птиц	30
А. С. Барашкова, Е. А. Рогожин Физиологические и морфологические аспекты действия защитных пептидов - нигеллинов семян нигеллы посевной (<i>Nigella sativa L.</i>) на грибы рода <i>Aspergillus</i>	31
Л. А. Калужский, О. В. Гнеденко, Т. В. Шкель, И. П. Грабовец, Е. О. Яблоков, П. В. Ершов, Ю. В. Мезенцев, П. С. Шабуня, С. А. Фатыхова, Н. В. Иванчина, А. А. Кича, А. М. Попов, А. А. Артюков, О. Н. Стышова, Э. П. Козловская, А. А. Гилеп, Н. В. Струшкевич, А. С. Иванов Морские организмы как источник потенциальных ингибиторов стерол-1,4- α -деметилаз	32
Е. О. Яблоков, Т. А. Сушко, П. В. Ершов, А. В. Флоринская, О. В. Гнеденко, Т. В. Шкель, А. М. Тумилович, И. П. Грабовец, Л. А. Калужский, Н. В. , А. А. Гилеп, А. С. Иванов Сравнительный анализ аффинности, термодинамики и функциональных характеристик взаимодействия двенадцати изоформ цитохромов P450 и их редокс-партнеров	33
Д. В. Попкова, А. А. Климович, О. В. Синцова Оптимизация условий получения рекомбинантного магнификамида и определение его биологической активности	34
В. М. Захаренко, Т. В. Маляренко Выделение и установление строения сфинголипидов из Дальневосточной морской звезды <i>Ceramaster patagonicus</i>	35
Р. А. Шкрабов, В. В. Суриц, Р. В. Усольцева, С. П. Ермакова Водорастворимые полисахариды из бурой водоросли <i>Sargassum microcystum</i> : структурные характеристики и противоопухолевая активность	36
А. Б. Кожушина, С. А. Колесникова, Е. Г. Ляхова, А. И. Калиновский, Р. С. Попов, Д. В. Бердышев Структурное изучение стеллеттинов Q и R - новых изомалабарикановых тритерпеноидов из морской губки <i>Stelletta sp.</i>	37
Н. К. Рубцов, А. С. Сильченко, С. П. Ермакова α -L-Фукозидазы фукоидан-деградирующего локуса морской бактерии <i>Wenyngzhuangia fucanilytica</i> CZ1127T	38
С. А. Козловский, Е. А. Пислягин, Е. А. Менчинская, Е. А. Чингизова, Г. Н. Лихацкая, Т. Ю. Горпенченко, Л. А. Калужский, А. С. Иванов, Ю. Е. Сабуцкий, С. Г. Полоник, Д. Л. Аминин Противовоспалительное действие синтетических производных 1,4-нафтохинонов, блокирующих пуринергические рецепторы P2X4 и P2X7-типов	39
Р. С. Калина, И. Н. Гладких, А. Н. Кветкина, О. В. Синцова, Е. В. Лейченко Применение алгоритма NULA для анализа аминокислотных последовательностей пептидов морской анемоны <i>Heteractis crispa</i>	40
А. П. Павленко, О. С. Маляренко, А. Н. Кветкина, С. А. Дышловой, Е. В. Лейченко Цитотоксическая активность актинопорина Hct-S3 морской анемоны <i>Heteractis crispa</i>	41
Д. Н. Пелагеев, К. Л. Борисова, В. Ф. Ануфриев	

Синтез природных хиноидных соединений и их аналогов на основе азидопроизводных нафтазарина	42
А. Б. Расин, Н. М. Шевченко, А. С. Сильченко, М. И. Кусайкин, Г. Н. Лихацкая, Т. Н. Звягинцева, С. П. Ермакова Взаимоотношения между структурой фукоидана из <i>Fucus evanescens</i> и его способностью образовывать наночастицы	43
А. А. Белик, А. Б. Расин, М. И. Кусайкин, С. П. Ермакова Сравнительный анализ действия бета-1,3-глюканаз морских бактерий <i>Formosa algae</i> и <i>Formosa agariphila</i>	44
Т. О. Мизгина, И. В. Чикаловец, В. И. Молчанова, О. В. Черников Структурные характеристики лектинов гемолимфы двустворчатого моллюска <i>Glycymeris yessoensis</i>	45
П. Д. Тимкин, Э. А. Тимофеев, Е. А. Бородин Использованием методов гибкого межмолекулярного взаимодействия in silico для оценки взаимодействия потенциальных лигандов с TRPM8	46
Э. А. Тимофеев, П. Д. Тимкин, Е. А. Бородин Биоинформатический анализ модифицированных лигандов для рецептора TRPM8	47
Стеновые доклады	
И. Н. Бакланов, Н. В. Гончаров Модификация лентивирусных векторных конструкций для флуоресцентного маркирования индуцированной гиперэкспрессии мутантных генов IDH1 и TP53	49
Г. О. Третьякова, Е. В. Федоренко, И. В. Свистунова, А. Г. Мирочник Бета-кетоиминаты дифторида бора: синтез, дуальная и кристаллизационно-индуцированная флуоресценция	50
Д. В. Шеховцева, А. П. Фильштейн, И. В. Чикаловец, Л.А. Романенко, М. С. Кокоулин, О. В. Черников Поиск новых лектинов морских глубоководных бактерий <i>Idiomarina abyssalis</i> KMM 227T и <i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231T	51
Т. А. Буланова, Т. О. Мизгина, И. В. Чикаловец, В. И. Молчанова, О. В. Черников Лектин мантии двустворчатого моллюска <i>Glycymeris yessoensis</i>	52
К. В. Тишакова, А. П. Лисачев, С. А. Романенко, А. С. Молодцева, Д. Ю. Прокопов, В. А. Трифонов Генетический состав половых хромосом заборной малахитовой игуаны (<i>Sceloporus malachiticus</i> , Iguania, Reptilia)	53
А. С. Сморгина, Е. А. Гольшева, С. А. Дзюба Кластеризация липидов в модельных биологических мембранах по данным двойного электрон-электронного резонанса, влияние холестерина и пептидов-антибиотиков.	54
В. В. Волконская, З. В. Огнева, К. В. Киселев Воздействие сверхэкспрессии генов стильбен синтаз VaSTS10c и VaSTS10d на устойчивость к абиотическим стрессам растений <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
К. Л. Борисова, Г. И. Мельман, Д. Н. Пелагеев, Б. П. Машинев, В. Ф. Ануфриев Простой подход к синтезу производных бензо[g]хромендиона. Синтез бихинона нового структурного класса, метаболита морских ежей <i>Mesocentrotus nudus</i> и <i>Strongylocentrotus intermedius</i> , и родственных соединений	56
В. В. Суриц, Р. В. Усольцева, Н. М. Шевченко, С. П. Ермакова Фукоиданы бурых водорослей семейства Sargassaceae: характеристики структуры и противоопухолевая активность	57
Информация о компании Merck	58
Авторский указатель	59

Пленарные доклады

Онкотераностика. Достижения, проблемы, перспективы

С. М. Деев

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
Электронная почта: biomem@mail.ru

Онкотераностика (терапия+диагностика) – дисциплина, которая объединяет диагностику злокачественного новообразования и персонифицированное лечение пациента, представляет собой перспективную медицинскую стратегию. В ее основе лежит точная диагностика молекулярных мишеней патогенных клеток и адресное воздействие на них для обеспечения высокой селективности противоопухолевой терапии. Тераностический подход в настоящее время является одним из самых динамично развивающихся направлений в лечении рака [1-3]. Последние достижения в области нанобиотехнологии позволили реализовать концепцию создания многофункциональных структур, в которых совмещаются функции детекции и терапии патогенных тканей, а также появляется возможность проводить мониторинг лечения.

Новый тип тераностических комплексов был создан на основе апконверсионных наночастиц (UCNP) состава $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Tm}$, в которых часть атомов иттрия была замещена бета-излучающим изотопом ^{90}Y . Наночастицы были покрыты полиэтиленгликолем, и уже к нему был присоединен рекомбинантный гибридный белок DARPIn-LoPE, состоящий из нацеливающего пептида с анкириновыми повторами (DARPIn 9_29, 14 кДа), специфически распознающего онкомаркер HER2 и фрагмент PE 40 экзотоксина А, полученного из синегнойной палочки. Комбинированная терапия с использованием полученного гибридного комплекса UCNP-R-T (R-радиоактивность, Т-токсин), продемонстрировала избирательную цитотоксичность в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека с избыточной экспрессией HER2 и значительный синергический эффект, ~ 2200 раз ($\text{IC}_{50} = 0,0024$ мкг/мл) по сравнению с доставкой каждого из токсических агентов по отдельности [4, 5].

Другим примером комбинированной иммуно/химиотерапии стала разработанная технология двойного региоселективного таргетинга, подразумевающая использование двух различных эпитопов одного и того же онкомаркера (в данном случае HER2) для нацеливания тераностических соединений, имеющих разный механизм действия. Мы использовали: (i) PLGA наночастицы, содержащие флуоресцентный краситель для визуализации (Nile Red) и химиотерапевтический препарат доксорубин; (ii) бифункциональный генно-инженерный иммунотоксин DARP-LoPE (42 кДа), включающий низкоиммуногенную модификацию терапевтического экзотоксина А *Pseudomonas* (LoPE) и ранее упомянутый нацеливающий пептид, DARPIn 9_29. В соответствии с предложенной стратегией первый химиотерапевтический наноагент был нацелен на субдомены III и IV рецептора HER2 с помощью аффибоды $Z_{\text{HER2}342}$ (8 кДа), тогда как второй агент, иммунотоксин, эффективно нацеливался на субдомен I того же рецептора HER2 молекулой DARPIn. Было продемонстрировано, что эта двойная стратегия нацеливания может усилить противоопухолевую терапию HER2-положительных клеток с очень сильным синергическим эффектом, который сделал возможным 1000-кратное снижение эффективной концентрации лекарственного средства *in vitro* и значительное улучшение терапии *in vivo* по сравнению с монотерапией. Более того, эта терапевтическая комбинация предотвратила появление вторичных опухолевых узлов. Таким образом, предложенная стратегия, использующая двойное нацеливание на один и тот же онкомаркер, может дать начало эффективным методам лечения агрессивных опухолей [6].

Мы также реализовали терапию двойного таргетинга на основе белковых препаратов, способных распознавать различные антигены на опухолевой клетке, оказывая взаимодополняющее направленное цитотоксическое действие. Была проведена комбинированная противораковая терапия с помощью различных агентов, нацеленных на HER2 и ErCAM, распространенные опухолевые антигены клеток рака молочной железы.

Комбинированный терапевтический эффект достигался за счет двух высокотоксичных белков – уже упомянутого LoPE и рибонуклеазы барназы из *Bacillus amyloliquefaciens*. Доставка токсинов в раковые клетки осуществлялась с помощью адресных полипептидов анти-HER2- и анти-ЕрСАМ-DARPinс. Мы показали, что одновременное лечение мышей с карциномой молочной железы (i) слитым токсином против ЕрСАМ на основе LoPE и (ii) HER2-специфическими липосомами, нагруженными барназой, приводит к одновременному устранению первичной опухоли и метастазов. Монаотерапия анти-HER2- или анти-ЕрСАМ-токсинами не оказывала сопоставимого эффекта на метастазы. Предлагаемый подход можно рассматривать как перспективную стратегию для значительного улучшения терапии рака [7].

Мультифункциональные наноматериалы представляются многообещающей платформой для таргетной терапии. Однако физико-химические свойства наночастиц также являются и причиной их недостатков. Они связаны, прежде всего, с быстрым выведением таких агентов из кровотока клетками мононуклеарной фагоцитарной системы (МФС) и системы комплемента, что приводит к их высокому поглощению печенью и селезенкой. Одним из перспективных методов продления циркуляции наночастиц без их модификации является блокада МФС. Этот метод временно снижает эндоцитоз макрофагов в ответ на поглощение малотоксичного нефункционального материала. Регулирование блокады МФС может существенно улучшить доставку диагностических и терапевтических наноматериалов к целевым патогенным тканям [8-10].

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2020-773.

Ссылки:

1. Bragina O., Chernov V., Schulga A., Konovalova E., Garbukov E., Vorobyeva A., Orlova A., Tashireva L., Sorensen J., Zelchan R., Medvedeva A., Deyev S., Tolmachev V. // J. Nucl. Med. 2021. doi: 10.2967/jnumed.121.262542.
2. Deyev S.M., Xu T., Liu Y., Schulga A., Konovalova E., Garousi J., Rinne S.S., Larkina M., Ding H., Gräslund T., Orlova A., Tolmachev V., Vorobyeva A. // Cancers (Basel). 2021. V. 13(14). № 3589.
3. Shilova O., Shramova E., Proshkina G., Deyev S. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22(9). № 4975.
4. Guryev E.L., Smyshlyaeva A.S., Shilyagina N.Y., Sokolova E.A., Shanwar S., Kostyuk A.B., Lyubeshkin A.V., Schulga A.A., Konovalova E.V., Lin Q., Roy I., Balalaeva I.V., Deyev S.M., Zvyagin A.V. // Molecules. 2020. V. 25(18). № 4302.
5. Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., Gudkov S.V., Balalaeva I.V., Volovetskiy A.B., Lyubeshkin A.V., Sen' A.V., Ermilov S.A., Vodeneev V.A., Petrov R.V., Zvyagin A.V., Alferov Z.I., Deyev S.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115(39). P. 9690-9695.
6. Shipunova V.O., Komedchikova E.N., Kotelnikova P.A., Zelepukin I.V., Schulga A.A., Proshkina G.M., Shramova E.I., Kutscher H.L., Telegin G.B., Kabashin A.V., Prasad P.N., Deyev S.M. // ACS Nano. 2020. V. 14(10). P. 12781-12795.
7. Shramova E., Proshkina G., Shipunova V., Ryabova A., Kamyshinsky R., Konevega A., Schulga A., Konovalova E., Telegin G., Deyev S. // Cancers (Basel). 2020. V. 12(10). № 3014.
8. Nikitin M.P., Zelepukin I.V., Shipunova V.O., Sokolov I.L., Deyev S.M., Nikitin P.I. // Nat. Biomed. Eng. 2020. V. 4(7). P. 717-731.
9. Mirkasymov A.B., Zelepukin I.V., Nikitin P.I., Nikitin M.P., Deyev S.M. // J. Control. Release. 2021. V. 330. P. 111-118.
10. Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Ivanov I.N., Yuryev M.V., Cherkasov V.R., Deyev S.M., Nikitin P.I., Nikitin M.P. // ACS Nano. 2021. doi: 10.1021/acsnano.1c00687.

Методологические подходы в создании лекарств нового поколения

Д. О. Дормешкин¹, Н. В. Струшкевич^{2,3}, А. А. Гилеп^{1,2,4}

¹ Институт биорганической химии НАН Беларуси

² ГК «Таргет Медикалс»

³ Сколковский Институт Науки и Технологий

⁴ ФГБНУ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

Электронная почта: agilep@yahoo.com

Современные терапевтические средства создаются с использованием рационального подхода и направлены на конкретную молекулярную мишень. В соответствии с этим первым этапом в разработке терапевтических средств является идентификация клинически значимых молекулярных мишеней, валидация данных мишеней и идентификация потенциальных лигандов и/или белков партнеров. На данном этапе ключевое значение имеют биоинформационные подходы, биохимический анализ, методы интерактомики, молекулярной биологии и структурной геномики. Последующие этапы создания терапевтического средства зависят от типа данного средства:

- Лекарственные средства в виде малых молекул (включая пептиды и макроциклы). Малые молекулы в настоящее время разрабатываются в случае, если молекулярная мишень имеет внутриклеточную локализацию.
- Биополимеры и макромолекулярные комплексы (включая средства для тераностики). Данный вид молекул использовался долгое время преимущественно в качестве заместительной терапии, но, начиная с конца прошлого века, широкое развитие в клинической практике получили таргетные моноклональные антитела. В настоящее время антигенсвязывающие модули используются также для направленной доставки макромолекулярных комплексов или наноструктурированных объектов.
- Инструменты для редактирования генома, применяемые, как правило, для восстановления утраченной функции, когда применение других терапевтических средств невозможно.
- Терапевтические средства на основе клеточной технологии. Данная технология терапии получило широкое развитие в последние десять лет для лечения онкогематологических заболеваний. Особое значение в данной области имеют подходы на основе адаптивной клеточной иммунотерапии с использованием генетически-модифицированных Т-лимфоцитов.

Первыми этапами создания лекарств являются идентификация Hit соединений, Hit-to-Lead оптимизация структуры и последующая Lead-оптимизация структуры соединений. На данных этапах ключевое значение имеют структурный анализ, хемоинформатика, медицинская химия, создание систем высокопроизводительного скрининга, а также создание модельных *in vitro* и клеточных систем для оценки эффективности, селективности и ADME-T параметров соединений. Основные критерии, по которым проводится оптимизация соединений:

- эффективность действия соединения на мишень;
- селективность действия соединений – оцениваемая по соотношению эффективности действия соединения на молекулярную мишень и на наиболее близкие к данной молекулярной мишени off-targets;
- ADME-T параметры.

В рамках доклада будет представлена информация о методологических подходах на начальных этапах создания терапевтических средств нового поколения. В качестве примеров будут представлены направления разработок авторов в области идентификации и структурно-функционального анализа молекулярных мишеней из числа ферментов, участвующих в биосинтезе и метаболизме стероидов, а также создания авторами терапевтических средств в области лечения онкологических, кардиометаболических и инфекционных заболеваний с применением малых молекул и CAR-T технологии.

**Исследование межмолекулярных взаимодействий с помощью технологии
поверхностного плазмонного резонанса (SPR)**

А. С. Иванов

ФГБНУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича

Электронная почта: professor-ivanov@yandex.ru

В настоящее время оптические биосенсоры, работающие на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR), стали одним из основных подходов при исследовании разнообразных межмолекулярных взаимодействий. Данная технология носит универсальный характер и позволяет регистрировать в реальном масштабе времени взаимодействия практически любых молекулярных объектов без использования каких-либо меток или сопряженных процессов. SPR биосенсоры могут работать в широком диапазоне концентраций и имеют очень высокую точность, воспроизводимость, чувствительность, что и обуславливает их востребованность как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях.

Дается обзор принципов работы оптических SPR биосенсоров, их основных технических характеристик и методов анализа получаемых данных с определением кинетических, равновесных и термодинамических параметров межмолекулярных взаимодействий [1].

На примерах работ, выполненных в разные годы в ИБМХ, показывается применимость SPR технологии для разнообразных фундаментальных и прикладных исследований межмолекулярных взаимодействий:

- взаимодействия типа «белок–белок» [2–3],
- взаимодействия типа «белок–низкомолекулярное соединение» [4–6],
- взаимодействия типа «белок–ДНК» [7],
- анализ олигомеризации белков и поиск ингибиторов димеризации [8],
- поиск прототипов лекарственных соединений, взаимодействующих с целевым белком-мишенью [9],
- биосенсорный анализ биомаркеров заболеваний [10–11],
- протеомные исследования и белковая интерактомика [12–14].

Широта применения технологии SPR биосенсоров подтверждается перечнем тематик НИР, выполняемых в ЦКП «Протеом человека» (ИБМХ) для коммерческих и академических заказчиков.

Ссылки:

1. Иванов А.С. // *Соврем. технол. мед.* 2012. Т. 4. С. 142-153.
2. Yablokov E.O. et al. // *Biochimie.* 2019. V. 162. P. 156-166.
3. Yablokov E.O. et al. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2021. V. 208. № 105793.
4. Гнеденко О.В. и др. // *Биомедицинская химия.* 2013. Т. 59(4). С. 388-398.
5. Medvedev A. et al. // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1295. P. 465-477.
6. Kaluzhskiy L. et al. // *Molecules.* 2021. V. 26. № 2237.
7. Рахметова С.Ю. и др. // *Биомедицинская химия.* 2010. Т. 56(1). С. 72-81.
8. Ершов П.В. и др. // *Биомедицинская химия.* 2009. Т. 55(4). С. 462-478.
9. Buneeva O. et al. // *Proteomics.* 2010. V. 10. P. 23-37.
10. Suprun E. et al. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 25. P. 1694-1698.
11. Gnedenko O.V. et al. // *Anal. Chim. Acta.* 2013. V. 759. P. 105-109.
12. Иванов А.С., А.Е. Медведев // *Биомедицинская химия.* 2015. Т. 61(2). С. 231-238.
13. Florinskaya A. et al. // *Sensors (Basel, Switzerland).* 2018. V. 18(5). № 1616.
14. Ershov P. et al. // *Biology (MDPI).* 2019. V. 8(49). P. 1-18.

Геномные технологии в биопроспектинге морских (микро)организмов

М. П. Исаева

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова,

Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: issaeva@gmail.com

Биопроспектинг (англ. bioprospecting – биоразведка) – научное направление, связанное с поиском и характеристикой биологических молекул с целью их коммерческого использования. В России комплексные исследования в области морского биопроспектинга проводит Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова (ТИБОХ ДВО РАН), в стенах которого открыта почти тысяча природных соединений, включая низкомолекулярные метаболиты и ферменты, разработаны способы их получения, для большинства изучены механизмы их действия. На основе этих соединений созданы лекарственные препараты, биологически активные добавки, продукты для ветеринарии и пищевого применения, а также медицинские диагностикумы и молекулярные инструменты для исследования биомолекул.

Ведущим трендом в развитии морского биопроспектинга является поиск новых биомолекул с применением геномных технологий, которые обеспечивают широкомасштабный и высокопроизводительный поиск уникальных и коммерчески ценных генов и генных кластеров в морских организмах, расшифровку геномов морских микроорганизмов – продуцентов биомолекул со свойствами, представляющими интерес для медицины и других областей человеческой деятельности.

В представленном докладе будут даны современное состояние и перспективы исследований в области геномного биопроспектинга морских экосистем на примере собственных изысканий и литературных данных.

Количественная масс-спектрометрия MALDI-TOF: возможности и особенности

И. Ю. Торопыгин

ФГБНУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича

Электронная почта: toropygin@rambler.ru

За два последних десятилетия масс-спектрометрия (МС) стала одним из основных инструментальных методов биохимических и молекулярно-биологических исследований. Однако в основном в идентификации биомолекул и особенно биополимеров. В задачах, требующих проведения количественных измерений, например определении концентраций или кинетических характеристик процессов, масс-спектрометрический подход оказывается трудоемким и затратным.

Причина кроется в физической природе метода – молекулярные массы определяют по параметрам движения ионов. Незаряженные молекулы остаются «невидимыми» для метода. Подсчитать количество ионов можно, но определить эффективность ионизации – долю молекул, перешедших в заряженное состояние, чаще всего невозможно. Поэтому методы количественных оценок интенсивности регистрируемых в масс-спектрометрах сигналов очень приближительны и могут приводить к ошибочным результатам.

Для точных количественных МС измерений используются внутренние стандарты – идентичные исследуемому веществу соединения, но с внедренными стабильными изотопами. Если речь не идет о совсем легких атомах, аналит и стандарт будут иметь одинаковую реакционную способность и хроматографическую подвижность. В смеси анализируемое вещество и стандарт одновременно сходят с колонки и образуют ионы с равной эффективностью, но в масс-спектре будут зарегистрированы как различные сигналы. По их относительной интенсивности определяют концентрацию изучаемого компонента.

Методы введения изотопов можно условно разделить на метаболические, химическую модификацию (аналит и стандарт модифицируются идентичными, но различными по изотопному составу группами) и изотопный обмен, спонтанное выравнивание изотопного состава между разными компонентами системы. Например, такой процесс достаточно быстро протекает между кислородом карбоксильных групп и воды и даже может катализироваться протеазами. Следовательно, изотопный обмен, а также более сложные, например, кинетические эксперименты, можно проводить в нативных условиях и с естественными субстратами.

Обратной стороной равновесной природы изотопного обмена, очевидно, является возможная утрата метки при смене растворителя. Поэтому при работе с такого рода стандартами наилучшим методом масс-спектрометрического анализа оказывается MALDI: анализируемое вещество смешивается и сокристаллизуется со специальным вспомогательным веществом и остается в твердом состоянии до момента измерения. Кристаллизацию можно проводить из самых разных растворителей, а ионы при измерении десорбируются непосредственно из твердой фазы.

Используя изотопное мечение обменом с кислородом ^{18}O , было показано, что изомеризация только одной аминокислоты в пептиде амилоида бета в четыре раза изменяет скорость гидролиза пептида АПФ. Очевидно, что использование химической модификации для введения изотопной метки существенно изменило бы результаты.

Ранний индуцибельный ответ и его роль в защите организма от инфекции

В. Н. Давыдова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова,

Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: viktoria@piboc.dvo.ru

Система врожденного иммунитета образует первую линию защиты от патогенов, проникающих в организм. Позже, как правило, через 96 часов после инфицирования, начинает развиваться адаптивный или приобретенный иммунитет, представляющий собой наиболее мощный и эффективный эшелон защиты организма [1]. Ранний индуцибельный ответ является связующим звеном между неспецифическим и специфическим иммунным ответом, его действие длится в течение 96 часов, пока не начнут работать факторы адаптивного иммунитета.

Ранний индуцибельный ответ включает клеточные и гуморальные факторы и заключается в формировании очага воспаления в месте локализации патогена. В качестве медиаторов воспаления выступают соединения пептидной природы, которые называются цитокинами. Синтез цитокинов происходит при активации клеток в результате взаимодействия так называемых толл-подобных рецепторов (обозначаемых как TLR) с макромолекулярными структурами патогена [2].

Известно 13 толл-подобных рецепторов млекопитающих, обозначаемых от *TLR1* до *TLR13*, которые связывают различные лиганды и продуцируются в организме различными типами клеток. Каждый тип этих рецепторов взаимодействует с определённым типом молекул патогенных организмов и посредством сложного каскада передачи сигнала в ядро клетки макроорганизма приводит к активации генов, отвечающих за синтез цитокинов [2].

Цитокины представляют собой большую и разнообразную группу небольших по размерам (8–80 кДа) пептидных молекул, секретируемых клетками. Цитокины регулируют межклеточные и межсистемные взаимодействия; определяют выживаемость, стимуляцию или подавление роста клеток, их дифференциацию, функциональную активность и апоптоз; обеспечивают согласованность действия иммунной, эндокринной и нервной систем в нормальных условиях и в ответ на патологические воздействия [3].

Защита организма от патогенов осуществляется в результате тесного взаимодействия клеток и молекул. Уровни цитокинов в сыворотке или других биологических жидкостях отражают текущее состояние работы иммунной системы, т.е. их синтез клетками *in vivo*. Индуцированный (различными стимуляторами, митогенами) синтез цитокинов отражает потенциальную, резервную способность клеток отвечать на антигенный стимул, в частности на действие лекарственных препаратов.

Ссылки:

1. Петров Р.В. // М.: ГЭОТАР-Медиа. 2011. 608 с.
2. Симбирцев А.С. // Иммунология. 2005. Т. 26. №. 6. С. 368-376.
3. Ройт А. // М.: Мир. 1991. 328 с.

Нуклеиновые кислоты как платформа для создания интеллектуальных лекарственных препаратов будущего

Е. А. Буракова^{1,2}, А. А. Фокина^{1,2}, А. Ш. Держалова¹, К. В. Клабенкова^{1,2}, Д. Э. Патрушев^{1,2},
С. Н. Бизяев^{1,3}, Д. А. Стеценко^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет

²Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение РАН

³Институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова, Сибирское отделение РАН

Электронная почта: d.stetsenko@nsu.ru

Аналоги нуклеиновых кислот с модифицированными фосфатными группами, такие как ДНК-тиофосфаты (Рисунок 1а), находят применение в медицине как антисмысловые терапевтические агенты. Реакция Штаудингера между фосфиттриэфиром и электрофильными азидами выступает подходящим способом получения широкого спектра производных олигонуклеотидов, модифицированных по фосфатной группе.

Было показано, что олигонуклеотиды, содержащие фосфорилгуанидиновые или мезилфосфорамидные группы (Рисунок 1б и 1в соответственно), могут выступать в роли антисмысловых агентов [1, 2]. Оба вида аналогов олигонуклеотидов высокоустойчивы к нуклеазам и способны образовывать стабильные комплементарные дуплексы с ДНК и РНК. Была выявлена способность мезилфосфорамидных олигодезоксинуклеотидов вызывать необратимое расщепление РНК-мишени путем активации фермента РНКазы H [2, 3]. Эти результаты позволяют сделать вывод о перспективности данных аналогов ДНК и РНК как антисмысловых терапевтических агентов.

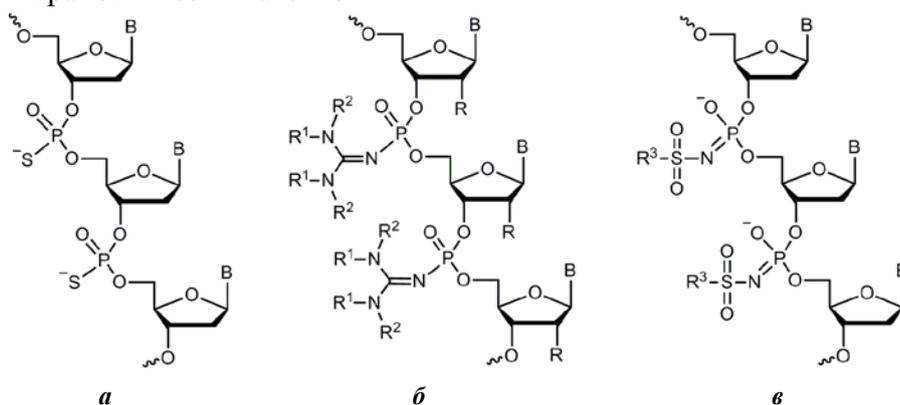


Рисунок 1. Аналоги нуклеиновых кислот: а) ДНК-тиофосфат; б) фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО): R = H, OMe, F; R¹ = Me, R² = CH₂ (Dmi); в) мезилфосфорамидный олигонуклеотид (μ): R³ = Me.

Работа поддержана РФФИ (гранты №№18-515-57006, 18-29-08062, 18-29-09045 и 20-04-60433) и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (проект Новосибирского государственного университета № FSUS-2020-0035).

Ссылки:

1. Skvortsova Yu.V., Salina E.G., Burakova E.A., Bychenko O.S., Stetsenko D. A., Azhikina T.A.// Front. Pharmacol. 2019.V.10. №1049.
2. Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2019. V. 116. P. 1229-1234.
3. Patutina O.A., Gaponova (Miroshnichenko) S.K., Sen'kova A.V., Savin I.A., Gladkikh D.V., Burakova E.A., Fokina A.A., Maslov M.A., Shmendel' E.V., Wood M.J.A., Vlassov V.V., Altman S., Stetsenko D.A., Zenkova M.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2020. V.117. P. 32370-32379.

Подходы к выделению и структурному анализу антимикробных пептидов растений

А. С. Барашкова

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Электронная почта: barashkova.an@gmail.com

Растения – перспективный источник соединений с антимикробными свойствами. Особый интерес представляют антимикробные пептиды (АМП). АМП являются компонентом врожденного иммунитета растений. Это преимущественно катионные молекулы массой от 2 до 10 кДа, чаще всего они стабилизированы дисульфидными связями, что обеспечивает им устойчивость к химической, термической и ферментативной деградации.

Классический подход к выделению АМП растений предполагает получение белково-пептидного экстракта из измельченного тем или иным способом растительного материала с дальнейшим фракционированием и характеристикой индивидуальных компонентов. Стратегию выделения АМП из растительного материала определяют исследовательские задачи, тактику – в большей степени определяют особенности выбранного биологического материала. В рамках выбора стратегии выделения АМП из растений существует два подхода: экстенсивный – направленный на выделение максимального разнообразия АМП из растения; и интенсивный – направленный на выделение из растения пептидов-представителей определенного семейства. Подбор тактики выделения АМП предполагает добавление или исключение дополнительных стадий, подбор экстрагентов, выбор методики фракционирования полученного экстракта. Так, отдельные ткани и органы растений могут требовать предварительной обработки для удаления мешающих компонентов. Выбор экстрагента позволяет сократить разнообразие выделяемых пептидов и тем самым упростить процесс фракционирования в случае интенсивного подхода к выделению пептидов.

Фракционирование белково-пептидных экстрактов проводится, как правило, путем комбинирования методов жидкостной хроматографии. Для получения индивидуальных пептидов используют метод обращенно-фазовой ВЭЖХ. Первичную структуру пептидов определяют методом N-концевого секвенирования по методу Эдмана или комбинированием методов масс-спектрометрии высокого разрешения. Принадлежность выделенного пептида к тому или иному структурному семейству определяют поиском по существующим базам данных (UniProtKB <http://uniprot.org>).

АМП присутствуют во всех тканях и органах растений, при этом композиция и количественный состав значительно варьирует от органа к органу. Комбинирование условий экстракции и фракционирования позволяет выделить и охарактеризовать широкое разнообразие пептидов, а также масштабировать их получение для функциональных исследований.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-74-10073-П).

Разнообразие антимикробных пептидов растений и беспозвоночных

Е. А. Рогожин^{1,2,3}

¹*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН*

²*Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе*

³*Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (X-Bio),*

Тюменский государственный университет

Электронная почта: rea21@list.ru; e.a.rogozhin@utmn.ru

На фоне отсутствия адаптивного иммунитета антимикробные пептиды (АМП) представляют собой важнейшие факторы врожденной иммунной системы растений и беспозвоночных животных, обеспечивающие их эффективную защиту от различных стрессовых факторов биотической и абиотической природы. Большинство АМП экспрессируются в данных организмах конститутивно и преимущественным образом имеют тканеспецифичную локализацию, однако для ряда структурных единиц показано участие в индуцированной защите в ответ на действие поражающего фактора (например, микробной инфекции). Антимикробным пептидам, выделенным из растений и различных беспозвоночных, свойственно достаточно широкое структурное разнообразие, которое в основном и формирует их классификацию: наличие посттрансляционных модификаций (главным образом, дисульфидных связей) и элементов вторичной структуры (альфа-спирали, бета-структуры), которые определяют тип пространственной укладки молекулы, которая, в свою очередь, создает основу для реализации функциональной активности. В рамках представленной работы проведен сравнительный анализ основных типов структуры АМП растений и беспозвоночных и спектра проявляемых ими антимикробных свойств (бактерицидная/бактериостатическая и фунгицидная/фунгистатическая активность) с целью выявления характерных структурно-функциональных взаимосвязей.

Данная работа поддержана проектом Российского научного фонда (грант № 18-74-10073-П).

Цитохромы P450 как мишень для лекарственных соединений: строение и функции

Е. О. Яблоков, Л. А. Калужский

ФГБНУ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

Электронная почта: evgeniy.yablokov@ibmc.msk.ru

Цитохромы P450 представляют собой суперсемейство ферментов-монооксигеназ, функция которых – введение атома кислорода в молекулу субстратов. Данные ферменты обнаружены у всех аэробных организмов, что говорит о филогенетической древности этих ферментов.

Как правило, все молекулы цитохромов P450 имеют пирамидообразную форму. На одном из полюсов этой пирамиды расположен канал для доступа субстратов в полость активного центра фермента, выстланную гидрофобными аминокислотами. Функция канала и полости заключается в осуществлении селекции субстратов и в их правильной ориентации относительно гема. Гем, в свою очередь, также расположен в центре белковой глобулы молекулы цитохрома P450.

Монооксигеназные системы эукариот можно поделить на два типа – микросомальные и митохондриальные. Микросомальные системы в качестве редокс-партнёра используют дифлавиновую мембран-связанную цитохром-P450 зависимую оксидоредуктазу. Митохондриальные цитохромы получают электроны от водорастворимых железо-серных белков ферредоксинов, которые в случае позвоночных называют адренооксином. Ферредоксины, в свою очередь, получают электроны от редуктаз ферредоксинов, представляющих собой флавопротеины. Таким образом, микросомальные системы двухкомпонентные, а митохондриальные содержат три компонента.

Наиболее высокие уровни экспрессии цитохромов в организме человека P450 были обнаружены в тонком кишечнике и печени, особенно много их обнаруживается в микросомах печени, поскольку цитохромы играют ключевую роль в синтезе желчных кислот и метаболизме ксенобиотиков. Помимо этого, цитохромы P450 играют значительную роль в биосинтезе стероидных гормонов. Вследствие этого значительные уровни экспрессии цитохромов обнаружены в коре надпочечников, мужских и женских половых железах, молочных железах, а также плаценте. Помимо этого, цитохромы также вовлечены в метаболизм ненасыщенных жирных кислот, витаминов, медиаторов воспаления, и, кроме этого, в биосинтез мембранных стеролов, ключевых компонентов клеточных мембран.

Цитохромы P450 играют существенную роль в биосинтезе многих биоактивных соединений, встречающихся в растениях: терпеноидов, флавоноидов, алкалоидов и многих других. Несмотря на то что их исследованиями занимаются уже более 50 лет, существует ещё множество нерешенных проблем в этой области, и в настоящий момент цитохромы P450 рассматриваются как перспективные мишени для разработки новых лекарств, направленных на лечение различных заболеваний.

Ионные каналы нервной, мышечной и иммунной систем: от низкомолекулярных и пептидно-белковых лигандов к структуре и механизмам функционирования

И. Е. Кашеверов

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Электронная почта: shak_ever@yahoo.com

Любой физиологический процесс каждого живого организма едва ли обойдется без участия ионных каналов, представляющих собой мембранные белки различной структурной организации от одиночной полипептидной цепи до сложных многосубъединичных комплексов. Одним из характерных представителей ионных каналов может служить семейство пяти-субъединичных цис-петельных рецепторов, наиболее изученными из которых являются никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР). К настоящему времени выявлены десятки различных подтипов нАХР традиционно подразделяемые на мышечные (представленные в мышцах животных, а также электрических органах рыб) и нейрональные (нейроны центральной и периферической нервной системы, а также другие типы клеток, включая клетки иммунной системы). Эти подтипы, образованные определенным сочетанием 17 различных субъединиц, выполняют различную функциональную роль во многих процессах, включая проведение нервного импульса, когнитивные функции, воспалительные реакции и другие.

Нарушение нормальной работы определенных подтипов нАХР является прямой или косвенной причиной таких заболеваний и патологий как миастении, болезни Альцгеймера и Паркинсона, эпилепсия, аутизм, никотиновая зависимость, болевые синдромы. Поиск эффективных средств для лечения этих заболеваний требует понимания различий в структурно-функциональных свойствах и механизмах функционирования многочисленных подтипов нАХР, а также инструментов для их детекции. Роль таких инструментов все годы исследования нАХР выполняют холинергические лиганды, к которым в настоящее время приписаны уже сотни соединений самой разной природы от низкомолекулярных веществ до белков. Несколько основных направлений использования подобных холинергических лигандов привели к тому прогрессу, который был достигнут в изучении структуры и функции разных нАХР из нервной, мышечной и иммунной систем.

Так, поиск и создание новых соединений, в основном на базе нейротоксинов из ядов змей и морских моллюсков Conus, позволило получить маркеры, высокоселективные к определенным подтипам нАХР, видоселективные и даже различающие разные участки связывания на одном рецепторе (включая ортостерические и аллостерические сайты). Привлечение к исследованиям водорастворимых ацетилхолин-связывающих белков (АХСБ) – структурных гомологов лиганд-связывающих доменов всех нАХР и самих рекомбинантных доменов – позволило получить их многочисленные кристаллические структуры в комплексе с различными лигандами и выявить молекулярный механизм функционирования канала, а также стало предпосылкой для получения криоэлектронных структур полноразмерных рецепторов. Эти фундаментальные достижения позволили вплотную приступить к практическому использованию некоторых лигандов нАХР в медицинской практике с наибольшими успехами в качестве миорелаксантов или косметических средств.

Устные доклады

Дисфункция митохондрий как предпосылка развития спорадической формы болезни Альцгеймера

М. А. Тюменцев, Д. Х. Юхтанов, Н. Г. Колосова
Институт Цитологии и генетики, Сибирское отделение РАН
Электронная почта: landselur@bionet.nsc.ru

Все больше данных свидетельствует о том, что дисфункция митохондрий является ранним событием в развитии спорадической формы (>95% случаев) болезни Альцгеймера (БА), но её вклад в переход от здорового старения к развитию заболевания остается недостаточно изученным. Мы исследовали последовательность и механизмы развития митохондриальной дисфункции на крысах OXYS, у которых спонтанно развиваются все ключевые признаки БА: деструктивные изменения и гибель нейронов, синаптическая недостаточность, гиперфосфорилирование тау-белка, усиленное накопление A β 1-42, снижение памяти и способности к обучению. Уже на «доклинической» стадии (20 дн.) у крыс OXYS выявляются структурно-функциональные изменения митохондрий нейронов гиппокампа и коры мозга, нарастающие при манифестации признаков БА (в возрасте 3–5 мес.) и их прогрессии (18–24 мес.). Так, в 20 дней у митохондрий нейронов коры и гиппокампа крыс OXYS снижена активность комплекса IV дыхательной цепи, что типично для пациентов с БА, и выявляются отклонения митохондриальной динамики на фоне изменений содержания и/или соотношения уровней белков слияния и деления. Также в период раннего постнатального развития в нейронах коры крыс OXYS обнаруживаются изменения внутриклеточного трафика митохондрий – особенно важного для функционирования синапсов удаленных от тел нейронов. Манифестация и прогрессия признаков БА происходят у крыс OXYS на фоне нарастающей дисфункции митохондрий и значительного снижения их количества в нейронах гиппокампа и коры мозга. Мы показали, что в основе структурно-функциональных изменений митохондрий лежат изменения экспрессии соответствующих генов. Согласно результатам анализа транскриптома (данных RNA-seq), экспрессия связанных с митохондриями генов в коре мозга крыс OXYS изменена в «доклинический» период и в периоды манифестации и прогрессии признаков БА. На всех стадиях развития заболевания изменения экспрессии генов также связаны с нейрональной пластичностью, каталитической активностью, липидными и иммунными процессами. Сравнение транскриптомов коры мозга крыс OXYS в возрасте 18 мес. и пациентов с БА выявило сходство в изменении экспрессии генов, связанных, прежде всего с митохондриями, иммунной, эндокринной и кровеносной системами, сигнальной трансдукцией, нейронными и синаптическими процессами, гипоксией и апоптозом. Интересно, что на фоне признаков митохондриальной дисфункции у крыс OXYS мы не обнаружили повышения продукции АФК митохондриями головного мозга на этапах манифестации и активной прогрессии признаков БА. Экспрессия генов, связанных с окислительным стрессом и редокс-статусом, также не имеет выраженных различий в период манифестации признаков БА. Умеренные признаки редокс-дисбаланса обнаруживаются у крыс OXYS только в возрасте 18 мес., уже после развития у них как митохондриальной дисфункции, так и признаков БА. Это позволяет предположить, что митохондриальная дисфункция у крыс OXYS возникает и долгое время прогрессирует независимо от оксидативного стресса. Таким образом, установлено, что дисфункция митохондрий опосредует и/или даже инициирует патологические молекулярные каскады у крыс OXYS и может рассматриваться как предиктор развития БА у людей.

Исследование поддержано грантом РФФ № 19-15-00044.

Задержка созревания мозга в раннем онтогенезе как возможная предпосылка развития болезни Альцгеймера

Е. А. Рудницкая¹, Т. А. Козлова¹, А. О. Бурняшева¹, Н. А. Стефанова¹, Д. А. Пеунов²,
Н. Г. Колосова¹

¹*Институт Цитологии и Генетики, Сибирское отделение РАН*

²*Новосибирский государственный университет*

Электронная почта: ekaterina.rudnitskaia@gmail.com

Болезнь Альцгеймера (БА) – неизлечимое нейродегенеративное заболевание, которое становится наиболее распространённой причиной сенильной деменции. Доклинический период БА может продолжаться десятилетиями, однако вопрос о том, когда начинает развиваться БА и что этому способствует, остается открытым. Только в последние годы исследователи обратили внимание на то, что уже в ранний постнатальный период могут формироваться предпосылки к снижению когнитивных способностей в более позднем возрасте: предполагается, что формирующиеся в ранний период жизни анатомические и функциональные параметры взрослого мозга могут влиять на его уязвимость к развитию БА и способность реализовать свои компенсаторные резервы [1]. Это определяет актуальность исследований молекулярно-генетических предпосылок и механизмов развития БА, для которых необходимы адекватные биологические модели заболевания. Исследования последних лет показали, что уникальной моделью наиболее распространенной спорадической формы БА может служить созданная в ИЦиГ СО РАН линия преждевременно стареющих крыс OXYS, у которых развиваются все ключевые признаки заболевания [2].

Нами выявлен феномен задержки созревания мозга крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар (контроль), о котором свидетельствуют отставание физического развития, формирования рефлексов и двигательных стереотипов, сдвиг пиков постнатального нейрогенеза и образования мшистых волокон в зубчатой извилине гиппокампа. При исследовании плотности и соотношения клеток нейронального ряда (нейробластов, незрелых и зрелых нейронов) мы выявили задержку миграции нейронов в кору головного мозга крыс OXYS, а также уменьшение размера ядер нейронов гиппокампа. Однако наиболее яркими были отличия от крыс Вистар в плотности и соотношении клеток глиального ряда (незрелых и зрелых астроцитов, микроглии) в гиппокампе и префронтальной коре, свидетельствующие о недостаточности астроцитарной поддержки нейронов и снижении плотности микроглии у крыс OXYS. Недостаточность астроцитарной поддержки может приводить к нарушению созревания нейронов, нейро- и синаптогенеза в критический период постнатального развития мозга. Снижение плотности микроглии в гиппокампе и префронтальной коре крыс OXYS происходит на фоне повышенной интенсивности постнатального апоптоза в этих структурах, что приводит к накоплению неметаболизируемого клеточного детрита и способствует ухудшению нейрональной функции. Важно отметить, что выявленная задержка в созревании мозга крыс OXYS компенсируется к окончанию ювенильного периода, но может вносить существенный вклад в развитие ранних нейродегенеративных изменений в дальнейшем.

Таким образом, нами получено экспериментальное доказательство того, что особенности созревания мозга в ранний постнатальный период могут формировать предрасположенность к ускоренному старению мозга, которое является основным фактором риска болезни Альцгеймера.

Ссылки:

1. Axelrud L.K. et al. // *Neurobiol. Aging*. 2019. V. 82. P. 10-17.
2. Rudnitskaya E. et al. // *Exp. Gerontol*. 2019. V. 115. P. 32-45.

Последствия раннего постнатального стресса: изменение реакции на социальный стресс и возрастная динамика уровня тревожности

К. А. Айриянц, В. В. Решетников, Ю. А. Рябушкина, П. Е. Кисаретова, Н. П. Бондарь

Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение РАН

Электронная почта: k.a.ayriyants@gmail.com

Стресс в раннем постнатальном периоде способен повлиять на развитие нервной системы, тем самым оказывая отставленное влияние на чувствительность к стрессовым событиям, а также на психическое здоровье в более позднем возрасте. Исследования на грызунах демонстрируют, что стресс разделения с матерью в раннем возрасте является тяжелым испытанием для потомства и способен приводить к долгосрочным негативным последствиям, которые, в подавляющем большинстве статей, оцениваются уже во взрослом периоде жизни животного. Кроме того, опыт перенесенного стресса может приводить в дальнейшем к увеличению или снижению чувствительности к негативным воздействиям, например к хроническому стрессу. Разнонаправленность последствий раннего постнатального стресса объясняется отчасти разностью протоколов, однако требует дальнейшей проверки с использованием различных возрастов и стрессовых воздействий.

Целью данной работы было исследовать на самцах мышей влияние разделения с матерью в раннем постнатальном периоде на тревожность в трех возрастных точках (детский, ювенильный и взрослый возраст), а также оценить чувствительность к дополнительному стрессу социальных поражений во взрослом возрасте. Животные с опытом стресса в раннем возрасте демонстрировали снижение тревожности в подростковом периоде, однако во взрослом периоде демонстрировали большую чувствительность к социальному стрессу, что выражалось в значительном увеличении тревожности на фоне сочетания двух стрессовых воздействий. Наблюдаемая разнонаправленная динамика изменения уровня тревожности может быть обусловлена адаптационными особенностями мышей в подростковом периоде жизни, однако дополнительный стресс во взрослом возрасте демонстрирует нарушения в реакции на стресс.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-15-00142.

Ссылки:

1. Hu Z., Hu Z., Naruna M., Gao H., Nourafkan E., Wen D. // Ind. Eng. Chem. Res. 2017. V. 56. P. 3456-3463.
2. Zueva O.S., Makarova A.O., Faizullin D.A. // Solid State Phenom. 2017. V. 265. P. 342-347.

Сравнение конформации первой гликозидной связи в голотурине В и его десульфатированном аналоге в растворе и в кристалле

А. С. Меньшов, Д. В. Бердышев, А. И. Калиновский

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: menshov90@piboc.dvo.ru

Установление пространственной структуры молекул биологического происхождения является одной из основных задач биоорганической химии, и физические методы позволяют выполнить данную задачу при минимальном количестве исследуемого вещества. Кроме того, большинство биомолекул способны принимать различные конформации, и вероятность нахождения в каждой зачастую отличается. Наиболее информативным экспериментальным методом в данном плане является метод ядерно-магнитного резонанса; зная константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) и скорости кросс-релаксации, можно определить конформацию молекулы в растворе.

В данной работе был проведен конформационный анализ соли тритерпенового гликозида иглокожего *Holothuria (Microthela) axiloga* – голотурин В (Рисунок 1) и его десульфатированного аналога в пиридине: методами 1D-селективного ROESY и NOESY определены расстояния между протонами H1' и H3, H1' и H2e, H1' и H28; из величин гетероядерных КССВ ($J_{C,H}$), найденных методом J-НМВС, определены двугранные углы для гликозидной связи между агликоном и ксилозой (H3-C3-O-C1', ψ_H и C3-O-C1'-H1', φ_H); произведено сравнение с аналогичными данными из рентгеноструктурного анализа.

Используя репараметризованные соотношения Карплюса для α - и β -гексапиранозидов JCX/SU09, определили для первой гликозидной связи голотурин В φ_H как $45,5^\circ$ и его десульфатированного аналога – $43,7^\circ$, а ψ_H – $-20,6^\circ$ и $-18,3^\circ$ соответственно, в то время как в кристаллической структуре φ_H $45,8^\circ$ и ψ_H $-5,6^\circ$. Расчеты, произведенные по методу B3LYP/6-311G+(d)_PCM с учетом влияния растворителя, пиридина, показали смещение термодинамического равновесия к конформерам с $\varphi_H \approx 46^\circ$ и $\psi_H \approx -17^\circ$.

Погрешность большинства отношений Карплюса оценивается в 0,5 Гц, а измерений КССВ – в 0,25 Гц, значения φ_H различаются в пределах среднеквадратичного отклонения, малый разброс объясняется экзоаномерным эффектом, в то время как значения угла ψ_H имеют большие различия, что связано с тем, что его величина определяется главным образом стерическими взаимодействиями.

Таким образом, конформации гликозидных связей в кристалле и в растворе могут различаться по крайней мере для угла ψ .

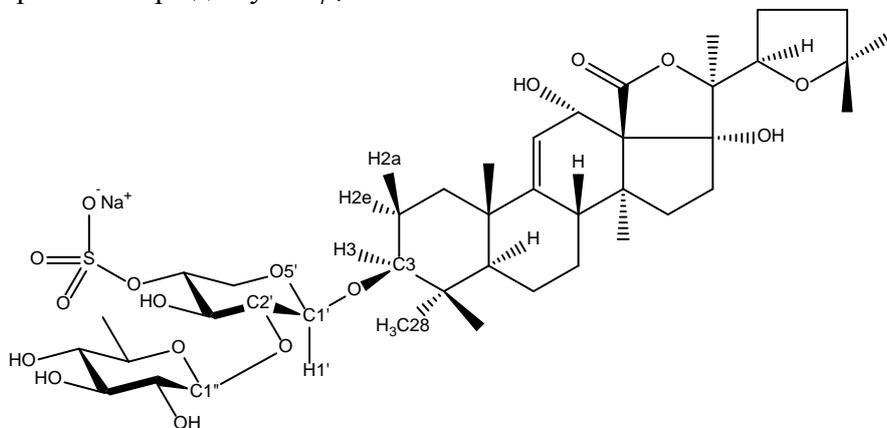


Рисунок 1. Голотурин В

Влияние стрессовых условий на регуляцию биосинтеза главных поринов *Yersinia pseudotuberculosis*

Е. П. Быстрицкая¹, Н. Ю. Чернышева¹, С. Н. Балдаев¹, А. В. Ракин², М. П. Исаева¹

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН

² Институт им. Фридриха Лёффлера, Федеральный научно-исследовательский институт
здоровья животных, Институт бактериальных инфекций и зоонозов, Йена, Германия
Электронная почта: belyjane@gmail.com

Неспецифические порины – главные белки наружной мембраны, изменение биосинтеза которых является одним из механизмов адаптации бактерии к неблагоприятным условиям. Регуляция экспрессии данных белков представляет сложную систему, контролирующую их продукцию на транскрипционном и трансляционном уровнях. Ранее нами был исследован транскрипционный ответ генов неспецифических поринов *Yersinia pseudotuberculosis* на воздействие различных стрессовых условий. Целью данной работы являлось изучение влияния некоторых стрессов на биосинтез OmpF и OmpC поринов и их баланс у *Y. pseudotuberculosis*.

В качестве объекта исследования был выбран штамм *Y. pseudotuberculosis* 488, вызывающий дальневосточную scarлатиноподобную лихорадку. Для создания стрессовых условий использовали следующие факторы: температура, осмотическое давление, воздействие антибиотиков. Сравнительную оценку синтеза OmpF и OmpC проводили с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза мембранных белков.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что баланс главных поринов значительно изменяется только в условиях стрессовых факторов окружающей среды (температурного и осмотического). Так, при высокой температуре и высоком осмотическом давлении превалирующим белком являлся OmpC, тогда как низкая температура и пониженный осмос сдвигали баланс в сторону OmpF. В то же время длительное воздействие антибиотиков разных классов (карбенициллин, хлорамфеникол, канамицин) не оказывало влияния на экспрессию главных поринов. Согласно ДСН-ПААГ-электрофореза их уровень был сравним с таковым при контрольных условиях, соответствуя балансу главных поринов, наблюдаемому при стационарной фазе роста бактерии. Можно предположить, что в данном случае неблагоприятные факторы окружающей среды являются доминирующими в регуляции экспрессии главных поринов *Y. pseudotuberculosis*.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что уровень главных поринов *Y. pseudotuberculosis* и их баланс согласуется с транскрипционным ответом их генов на воздействие исследуемых стрессовых факторов.

Ссылки:

1. De la Cruz M.A., Calva E. // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 18(1). P. 24-36.
2. Bystritskaya E., Chernysheva N., Stenkova A., Guzev K., Rakin A., Isaeva M. // Molecules. 2021. V. 26(13). № 3956.

Влияние топологии листа мягкой пшеницы *Triticum aestivum* на рост ростковых трубок спор бурой ржавчины *Puccinia triticina*

Е. Ю. Букатич, А. В. Дорошков, У. С. Зубаирова

Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение РАН

Электронная почта: bukatich@bionet.nsc.ru

Бурая ржавчина *Puccinia triticina* – базидиомицет, патоген мягкой пшеницы. Эпифитотии этого патогена при благоприятных условиях могут значительно снизить урожайность. Понимание ранних процессов развития спор бурой ржавчины может быть полезным для предотвращения развития спор на поверхности листьев.

После попадания на лист и адгезии к поверхности спора бурой ржавчины формирует ростковую трубку. По мере прорастания ростковая трубка находит на поверхности листа устьице, формирует специальную структуру – аппрессорий – и проникает внутрь растения. Существуют два наиболее значимых фактора для развития ростковой трубки: химический сигнал воска и кутикулы растений и топографический – структура поверхности листа. Для развития некоторых видов *Puccinia* необходим именно топографический фактор – рост трубок происходил перпендикулярно выпуклым структурам поверхности листа. Однако для других видов (*Puccinia graminis*) была показана необходимость химического фактора для развития трубок.

В работе изучено влияние таких топографических параметров, как амплитуда высот поверхности, общий наклон уровня поверхности, глубина расположения устьиц и т.д. на направление роста ростковых трубок бурой ржавчины *Puccinia triticina*. Разработан метод флуоресцентного окрашивания спор бурой ржавчины, и проведен анализ конфокальных изображений патогена на поверхности листа мягкой пшеницы. Разработан протокол оценки влияния топографии поверхности листа на эффективность проникновения патогена внутрь растения. Наблюдаемое прорастание спор вне поверхности листа (на трихомах) может говорить о химических сигналах (кутикулярном воске) как о необходимых для инициации прорастания спор, однако направление роста трубки задается, вероятно, именно структурой поверхности.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-10037).

Изменения баланса в системе глутамат/ГАМК в сетчатке при старении и развитии ретинопатии, аналогичной возрастной макулярной дегенерации

Д. В. Телегина¹, А. К. Антоненко^{1,2}

¹*Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение РАН*

²*Новосибирский государственный университет*

Электронная почта: telegina@bionet.nsc.ru

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является основной причиной потери зрения людьми старше 60 лет. Эффективных способов профилактики и лечения этого многофакторного нейродегенеративного заболевания нет, что обусловлено неполнотой знаний его этиологии и патогенеза. Предполагается, что связанные со старением изменения в сетчатке синтеза глутамата и γ -аминомасляная кислоты (ГАМК) – наиболее универсальных нейротрансмиттеров, которые осуществляют функции основного возбуждающего (глутамат) и тормозного (ГАМК) медиаторов, могут быть предпосылкой развития ВМД и вносят существенный вклад в их прогрессию. Тем не менее, данные об изменениях системы глутамата/ГАМК на разных стадиях ВМД, тем более на ранней, доклинической стадии, практически отсутствуют.

Целью данной работы явилось исследование связи развития ВМД с изменениями синтеза глутамата и ГАМК на линии крыс OXYS – уникальной модели преждевременного старения, одним из проявлений которого становится развитие аналогичной ВМД ретинопатии. Использовали крыс OXYS в период, предшествующий развитию клинических проявлений ВМД (в возрасте 20 дней), в период их манифестации (3 мес.) и активной прогрессии (18 мес.). Контролем служили одновозрастные крысы Вистар.

Исследование содержания ферментов синтеза (глутаминаза) и расщепления (глутаминсинтетаза) глутамата и синтеза (GAD67) и расщепления (GABAT) ГАМК показало, что у крыс Вистар уровень белков глутаминазы и глутаминсинтетазы постепенно увеличивается с возрастом и в 18 мес. становится достоверно выше, чем в возрасте 20 дней. У крыс OXYS манифестация клинических признаков ретинопатии (3 мес.) происходит на фоне повышенного по сравнению с крысами Вистар уровня этих ферментов, что может быть обусловлено компенсаторными процессами. Исследование уровня ферментов синтеза ГАМК показало, что у крыс обеих линий с возраста 20 дней до 3 мес. значительно возрастает уровень GAD67 и GABAT, а затем эти параметры снижаются к возрасту 18 мес. При этом достоверных межлинейных различий выявлено не было.

Транспортеры глутамата в астроцитах, в том числе глутамат-аспартатный транспортер GLAST, являются единственным существующим механизмом внеклеточного удаления глутамата и имеют большое значение для поддержания низких и нетоксичных концентраций этого нейромедиатора. Мы обнаружили, что с возрастом у крыс обеих линий происходит повышение содержания транспортера GLAST в сетчатке, при этом развитие нейродегенеративных изменений у крыс OXYS происходит на фоне его пониженного содержания: в период манифестации клинических признаков ретинопатии у крыс OXYS уровень белка GLAST на 30% ниже, чем у крыс Вистар.

В целом, полученные результаты указывают на то, что манифестация клинических признаков ретинопатии у крыс OXYS в возрасте 3 мес. происходит на фоне повышения в сетчатке уровня глутамата и снижения его транспортера. Такая ситуация, возможно, приводит к накоплению избыточного уровня глутамата в синаптической щели, и, как следствие, усилению повреждения нейронов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 21-75-00029.

Использование реакции Штаудингера для получения конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих амидную связь при модифицированной фосфатной группе

К. В. Клабенкова^{1,2}, Е. А. Буракова^{1,2}, С. Н. Бизяев^{1,3}, А. А. Фокина^{1,2}, Д. А. Стеценко^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет

²Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение РАН

³Институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова, Сибирское отделение РАН

Электронная почта: k.klabenkova@g.nsu.ru

Синтетические производные олигонуклеотидов, способные высокоселективно воздействовать на биологические молекулы РНК, рассматриваются в настоящее время в качестве перспективных терапевтических агентов. Однако существующие производные олигонуклеотидов с трудом проникают в клетки, что затрудняет их внедрение в клиническую практику. Одним из возможных способов решения данной проблемы является конъюгация олигонуклеотида с остатками полиаминов, которые способны улучшать проникновение в клетку за счет введения в состав олигонуклеотида положительно заряженных групп.

Ранее было показано, что реакция Штаудингера между сульфонилазидом и межнуклеотидным фосфиттриэфиром может служить подходящим способом получения конъюгатов олигонуклеотидов [1]. В данной работе были получены пентафторфениловый (**1a**) и 4-нитрофениловый (**16**) эфиры 4-карбоксібензолсульфонилзида, при помощи которых по реакции Штаудингера были синтезированы олигонуклеотиды с активированной карбоксильной группой. После обработки избытком первичного алкиламина, удаления защитных групп и отщепления от полимера был с хорошим выходом получен ряд конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих амидную связь, в том числе с остатком полиамина (Рисунок 1).

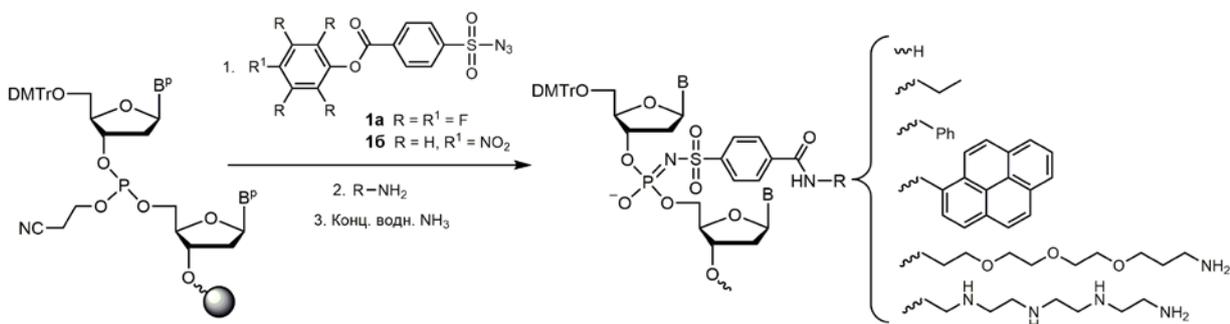


Рисунок 1. Получение конъюгатов олигонуклеотидов с аминами через модифицированную фосфатную группу по реакции Штаудингера. Сокращения: DMTr – 4,4'-диметокситритильная группа; B^P/B – N-защищенное/незащищенное гетероциклическое основание

Работа поддержана РФФИ (гранты №№18-515-57006, 18-29-08062, 18-29-09045 и 20-04-60433) и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (проект Новосибирского государственного университета № FSUS-2020-0035).

Ссылки:

1. DerzhalovaA., MarkovO., FokinaA., ShiohamaY., ZatsepinT., FujiiM., ZenkovaM., StetsenkoD. // Appl. Sci. 2021. V. 11. № 1174.

Цитогенетические и гистологические последствия формирования гибридной стерильности у серых полевков

Т. И. Бикчурина^{1,2}, Е. А. Кизилова^{1,2}, Ф. Н. Голенищев³

¹Новосибирский государственный университет

²Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение РАН

³Зоологический институт, РАН

Электронная почта: t.bikchurina@g.nsu.ru

Формирование репродуктивной изоляции происходит на ранних этапах видообразования. У млекопитающих одним из ключевых механизмов репродуктивной изоляции является гибридная стерильность. Серые полевки группы «*mystacinus*» рода *Microtus* (Rodentia; Arvicolinae) с неясным таксономическим статусом представляют собой удобную модель для изучения начальных стадий видообразования. Для выяснения цитологических механизмов формирования гибридной стерильности между видами рода *Microtus* и уточнения таксономического статуса полевков группы «*mystacinus*» мы провели анализ репродуктивного статуса, анализ динамики сперматогенеза и выявили особенности синапсиса и рекомбинации хромосом в мейозе самцов межвидовых гибридов F1 между пятью видами рода *Microtus*.

Мы показали, что самцы межвидовых гибридов *M. mystacinus*, *M. kermanensis* и *M. rossiaemeridionalis* группы «*mystacinus*» стерильны, поэтому их следует рассматривать как валидные виды. Степень нарушений сперматогенеза у всех исследованных гибридов в целом возрастала с увеличением филогенетической дистанции между родительскими видами. Однако внутри некоторых групп гибридов мы наблюдали прохождение сперматогенеза до разных стадий. Так, у гибридов между близкородственными видами *M. kermanensis* и *M. rossiaemeridionalis* мы наблюдали нормальный синапсис и рекомбинацию большинства аутосом в первой профазе мейоза и широкую вариацию стадий останковки сперматогенеза: от сперматогоний до зрелых аномальных сперматозоидов. Гибриды между наиболее удаленными видами *M. kermanensis* и *M. transcaspicus* демонстрировали отсутствие кроссоверов и полный асинапсис всех аутосом; сперматогенез не проходил дальше начала профазы I. Асинапсис хромосом, по-видимому, являлся основной причиной мейотического ареста и апоптоза сперматоцитов у всех исследуемых гибридов F1.

Данная работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 19-04-00557а; 0259-2021-0011) и Министерства науки и Высшего образования РФ Института Цитологии и Генетики (№ 2019-0546 (FSUS-2020-0040)) и Института Зоологии (№ АААА-А19-119032590102-7).

Поведение в мейозе и наследственная передача хромосомы, специфичной для клеток зародышевого пути, у певчих птиц

Л. П. Малиновская^{1,2}, П. М. Бородин^{1,2}, А. А. Торгашева^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет

²Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение РАН

Электронная почта: l.malinovskaia@g.nsu.ru

Все исследованные на сегодняшний день представители подотряда певчие птицы имеют дополнительную хромосому, специфичную для зародышевой линии, которая отсутствует в клетках соматической линии (germ-line-restricted chromosome, далее GRC). Эта хромосома, как правило, элиминируется в сперматогенезе и передается преимущественно по материнской линии.

Используя методы иммулокализации ключевых белков мейоза и флуоресцентную *in situ* гибридизацию с GRC-специфичными пробами, мы показали, что мейотическое поведение GRC у видов-близнецов ласточки-береговушки (*Riparia riparia*) и бледной ласточки (*R. diluta*) схоже с поведением GRC у двух видов амадин: зебровой (*Taeniopygia guttata*) и японской амадины (*Lonchura striata domestica*). Пахитенные ооциты большинства самок содержали две копии GRC. У самцов GRC, как правило, присутствовала в одной копии. Среди самцов бледной ласточки мы обнаружили мозаиков по числу копий GRC: их пахитенные клетки содержали от одной до трех копий этой хромосомы. После первого мейотического деления GRC визуализировалась за пределами ядер как округлое тело конденсированного хроматина. Сперматозоиды не содержали GRC.

Мы предполагаем, что особенности поведения GRC в мейозе у ласточек и амадин сформировались под давлением отбора и способствуют преимущественному попаданию GRC в яйцеклетку. Мы предложили сценарий наследственной передачи этой хромосомы, основанный на нерасхождении GRC в первом делении мейоза, которое способствует сегрегации GRC в ооцит. Нормальная сегрегация сестринских хроматид во втором делении мейоза приводит к формированию яйцеклеток с одной или двумя GRC (в зависимости от изначального числа копий GRC в зиготе). Вероятно, наблюдаемые особенности поведения обеспечивают эффективную передачу GRC в ряду поколений и ее функционирование в раннем эмбриогенезе и гаметогенезе. Это подтверждается тем, что ни одной певчей птицы без GRC до сих пор обнаружено не было.

Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ №20-64-46021 и гранта Министерства образования и науки Российской Федерации №2019-0546 (FSUS-2020-0040).

Физиологические и морфологические аспекты действия защитных пептидов нигеллинов семян нигеллы посевной (*Nigella sativa* L.) на грибы рода *Aspergillus*

А. С. Барашкова^{1,2}, Е. А. Рогожин^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

²Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (X-Bio),

Тюменский государственный университет

Электронная почта: barashkova.an@gmail.com

Антимикробные пептиды (АМП) растений представляют собой компоненты врожденного растительного иммунитета. АМП растений объединены в 8 структурных семейств (тионины, дефензины, липид-переносящие белки, α -харпинины, гевеиноподобные пептиды, ноттины, циклотиды, снакины); кроме того, выделяют некоторое количество неклассифицированных пептидов. АМП растений обладают широким спектром антимикробной активности, преимущественно в отношении грибов, и рассматриваются как перспективная альтернатива существующим антифунгальным препаратам, применяемым в медицине и сельском хозяйстве. Известно, что антимикробная активность большинства таких молекул связана с их амфифильностью и реализуется через разрушение клеточной мембраны. Данный механизм действия ассоциирован с прямым фунгицидным эффектом. Между тем для α -харпининов было описано фунгистатическое действие по отношению к грибам рода *Fusarium*. α -Харпинины представляют собой короткие пептиды, пространственная структура которых стабилизирована двумя дисульфидными связями и представляет собой две α -спирали, соединенные через β -поворот. В данной работе представлены результаты тестирования пептида нигеллина – представителя нового структурного подсемейства α -харпининов – на наличие антифунгальной активности по отношению к мицелиальному грибу *Aspergillus niger*.

В качестве источника АМП были взяты семена нигеллы посевной (*Nigella sativa* L.). Это растение рассматривается как источник биологически активных соединений при производстве косметики и препаратов для фитотерапии, а также в кулинарии. Ранее из семян нигеллы посевной были выделены антимикробные пептиды семейства тионинов, дефензинов, липид-переносящих белков. Выделенный пептид (нигеллин) обладает характерной для α -харпининов пространственной структурой, что позволяет считать его представителем нового структурного подсемейства α -харпининов, стабилизированных тремя дисульфидными связями. Нигеллин был протестирован на наличие антифунгальной активности в отношении мицелиального гриба *A. niger*, и было оценено влияние широкого диапазона концентраций пептида (64–0,125 μ M) на рост гриба с целью определения минимальной ингибирующей концентрации. Было обнаружено, что даже максимальная концентрация не вызывала полного подавления роста гриба, а лишь вызывала задержку его начала, при этом была обнаружена стимуляция спорообразования. Отсутствие прямого фунгицидного эффекта было подтверждено методом флуоресцентной микроскопии с использованием красителя LIVE/DEAD (Molecular Probes, Waltham). Была проведена оценка жизнеспособности спор гриба после инкубации с пептидом и через 3, 6 и 24 часа роста в присутствии нигеллина в концентрации 64 μ M. Было показано, что число повреждённых спор при инкубации и росте в присутствии пептида не превышало такового в контроле. Таким образом, новый пептид нигеллин не обладает прямым фунгицидным действием, но в высокой концентрации вызывает задержку роста гриба, а также стимулирует спорообразование. Вероятно, антифунгальные свойства нигеллина связаны с ранее показанным для α -харпининов фунгистатическим действием.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-74-10073-П).

Морские организмы как источник потенциальных ингибиторов стерол-14- α -деметилаз

Л. А. Калужский¹, О. В. Гнеденко¹, Т. В. Шкель², И. П. Грабовец², Е. О. Яблоков¹,
П. В. Ершов¹, Ю. В. Мезенцев¹, П. С. Шабуня², С. А. Фатыхова², Н. В. Иванчина³,
А. А. Кича³, А. М. Попов³, А. А. Артюков³, О. Н. Стышова³, Э. П. Козловская³,
А. А. Гилеп^{1,2}, Н. В. Струшкевич⁴, А. С. Иванов¹

¹ ФГБНУ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

² Институт биоорганической химии НАН Беларуси

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН

⁴ Сколковский институт науки и технологий

Электронная почта: leonid.kaluzhskiy@ibmc.msk.ru

Стерол-14- α -деметилазы (гемопротеины семейства цитохромов P450(51), CYP51) участвуют в биосинтезе различных стеролов, включая холестерол, ситостерол и эргостерол, играющих ключевую роль в формировании клеточных мембран животных, растений и грибов. Сегодня ингибиторы CYP51 класса азолов активно применяются для лечения микозов и паразитарных инвазий, однако данный класс препаратов обладает широким спектром действия на различные ферменты семейства цитохромов P450, что приводит к множественным побочным эффектам. В то же время остро стоит вопрос распространения резистентности патогенов к азолам вследствие их широкого применения в клинике. Вследствие этого CYP51 патогенных микроорганизмов и грибов рассматривают как перспективную мишень для создания новых селективных антипаразитарных препаратов, которые были бы эффективны против азол-резистентных штаммов. Одновременно CYP51 представляют собой привлекательную мишень для создания новых антиатеросклеротических и противоопухолевых препаратов, направленных на ингибирование биосинтеза холестерина.

Мы провели поиск потенциальных ингибиторов CYP51 человека среди природных биологически активных соединений, выделенных из морских животных и растений. Поиск был проведён методами поверхностного плазмонного резонанса, спектрального титрования и измерения активности CYP51 в реконструированной системе цитохрома P450 с последующей детекцией продукта с помощью масс-спектрометрии. Способность ингибировать CYP51 человека была показана для стеролов, хенрициозида H1 и левискулозида G, выделенных из морской звезды *Henricia derjugini*, а также флавоноидов, лютеолина и 7,3'-дисульфата лютеолина, выделенных из морской травы *Zostera marina*. Интересным наблюдением было то, что для 7,3'-дисульфата лютеолина не было показано взаимодействие в зоне активного центра фермента. Механизм ингибирования ферментативной активности CYP51 7,3'-дисульфатом лютеолина посредством блокирования канала доступа субстрата был предположен на основе гипотез молекулярного докинга. Таким образом, было показано, что биологически активные соединения морских организмов могут представлять собой обширный источник для поиска новых базовых структур для разработки лекарственных препаратов, направленных на ингибирование активности CYP51.

Работа была выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) и при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00014, а также государственной программы научных исследований на 2021–2025 годы «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорганическая химия» республики Беларусь.

Сравнительный анализ аффинности, термодинамики и функциональных характеристик взаимодействия двенадцати изоформ цитохромов P450 и их редокс-партнеров

Е. О. Яблоков¹, Т. А. Сушко^{2,3}, П. В. Ершов¹, А. В. Флоринская¹, О. В. Гнеденко¹, Т. В. Шкель³,
А. М. Тумилович³, И. П. Грабовец³, Л. А. Калужский¹, Н. В. Струшкевич⁴, А. А. Гилеп^{1,3},
А. С. Иванов¹

¹ ФГБНУ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

² Отдел биоинженерии, школа инженерии, Университет Токио

³ Институт биоорганической химии Национальной академии наук республики Беларусь

⁴ Сколковский Институт Науки и Технологии

Электронная почта: evgeyablokov1988@mail.ru

Цитохромы P450 представляют собой большое суперсемейство монооксигеназ, которые обнаруживаются во всех доменах живых систем, особенно у эукариот. Целью данной работы было установить различия в термодинамике белок-белковых взаимодействий и определить функциональные различия компонентов митохондриальных (mitCYP) и микросомальных (micCYP) монооксигеназных P450-зависимых систем. Всего было использовано 12 различных изоформ цитохромов P450 и два редокс-партнера: НАДФН-зависимая цитохром P450 редуктаза (CPR) и адренодоксин (Adx). Выполнен сравнительный анализ аффинности, термодинамики, ферментативной активности и способности к одноэлектронному восстановлению. Определение равновесной константы диссоциации (Kd) белок-белковых взаимодействий было выполнено с использованием оптического биосенсора на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore3000. CPR и Adx взаимодействуют как с micCYP, так и с mitCYP с различным сродством (значения Kd варьируются от 0,01 до 2 мкМ). По термодинамике межмолекулярного взаимодействия все комплексы micCYP и mitCYP с редокс-партнерами можно разделить на три группы в зависимости от преобладающей роли энтальпии или энтропии. Около 90% комплексов CYP/редокс-партнер образовывались за счёт энтропии. Вклад энтальпии и энтропии значительно отличался в случае комплексов mitCYP/Adx. Комплекс CYP11A1/Adx был энтальпийно-зависимым, в то время как комплексы CYP11B1/Adx и CYP11B2/Adx были смешанного типа (был важен вклад как энтальпии, так и энтропии). Термодинамическая дискриминация комплексов mitCYPs/Adx, вероятно, связана с различной функциональной ролью CYP11A и CYP11B. Исключением был энтальпийно-энтропийный (смешанный) комплекс CYP21A2/Adx. Было обнаружено, что CPR и Adx способны передать первый электрон на micCYP, тогда как mitCYP продемонстрировали высокую специфичность по отношению к Adx. Продуктивный катализ для mitCYPs наблюдался только в присутствии пары Adx/НАДФН-зависимая адренодоксинредуктаза (AdR), тогда как в случае стероидогенных micCYP (CYP17A1, 19A1 и 21A2) он был обнаружен в присутствии как CPR, так и пары Adx/AdR.

С точки зрения эволюции электронно-транспортная система 1-го типа (mitCYPs, Adx и AdR) значительно увеличила специализацию белок-белковых взаимодействий (ББВ), что сопровождалось увеличением специфичности переноса электрона. Напротив, эволюция системы транспорта электронов 2-го типа (micCYPs и CPR) привела к увеличению универсальности межмолекулярных взаимодействий, что продемонстрировано для стероидогенных микросомальных цитохромов P450.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) и при поддержке гранта РФФИ №20-04-00014.

Оптимизация условий получения рекомбинантного магнификамида и определение его биологической активности

Д. В. Попкова^{1,2}, А. А. Климович¹, О. В. Синцова¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН

²Дальневосточный федеральный университет

Электронная почта: daria.vladipo@yandex.ru

В связи с ростом среди всех групп населения частоты встречаемости сахарного диабета 2 типа актуальным становится вопрос нахождения эффективных лекарственных препаратов, способных корректировать метаболизм углеводов. Одним из способов борьбы с повышенным уровнем глюкозы в крови является ингибирование панкреатической α -амилазы, осуществляющей гидролиз основного пищевого полисахарида, крахмала, что значительно снижает поступление глюкозы в кровь из ЖКТ. В практике широко используется олигосахарид акарбоза (GlucobayTM), который является слабым ингибитором фермента, что приводит к необходимости использования больших концентраций действующего вещества.

Развитие методов генной инженерии способствует росту количества лекарственных препаратов на основе технологии рекомбинантных ДНК. Для морской анемоны *Heteractis magnifica* с использованием штамма *Escherichia coli* BL21(DE3) с выходом 4 мг на 1 л клеточной культуры был получен рекомбинантный пептид, аналог магнификамида [1], доказавший свою ингибиторную активность против свиной панкреатической и человеческой слюнной α -амилаз *in vitro*. Магнификамид оказался в тысячу раз эффективнее акарбозы и рассматривается в качестве потенциального средства для контроля постпрандиальной (после еды) гипергликемии. Пептид относится к семейству β -дефензинов, для которых характерно наличие трех дисульфидных связей в третичной структуре, в связи с чем для оптимизации условий экспрессии был выбран штамм *Escherichia coli* SHuffle[®] [2]. В результате с 1 л клеточной культуры сочетанием методов металл-аффинной хроматографии, обессоливания, обработки энтерокиназой и финальной очистки ОФ ВЭЖХ было получено 1,4 мг белка, вследствие чего было принято решение в дальнейшем проводить экспрессию в штамме BL21(DE3).

Для определения активности магнификамида *in vivo* был проведен эксперимент с измерением уровня глюкозы у здоровых мышей линии CD-1 без признаков сахарного диабета после введения крахмала. Измерения выполнялись сразу после введения ингибитора, через 30 минут вместе с введением крахмала и далее 4 раза с интервалом в 30 минут. В качестве отрицательного контроля выступала группа, получившая крахмал без ингибитора. Эффективность ингибирования измерялась относительно действия противодиабетического препарата акарбозы (GlucobayTM) в дозе 3 мг/кг. Было выявлено, что исследуемый пептид в концентрациях 0,1 и 0,5 мг/кг не оказывает токсического влияния на животных и способствует поддержанию более низкого уровня глюкозы в крови в течение всего времени наблюдения, чем в контрольной группе.

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда № 21-74-20147.

Ссылки:

1. Sintsova O., Gladkikh I., Kalinovskii A., Zelepuga E., Monastyrnaya M., Kim N., Shevchenko L., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E., Leychenko E. // *Mar. Drugs*. 2019. V. 17. P. 542.
2. Lobstein J., Emrich C.A., Jeans C., Faulkner M., Riggs P., Berkmen M. // *Microb. Cell Fact*. 2012. V. 11. № 753.

**Выделение и установление строения сфинголипидов из Дальневосточной морской звезды
*Ceramaster patagonicus***

В. М. Захаренко¹, Т. В. Маляренко^{1,2}

¹Дальневосточный федеральный университет

²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: malyarenko-tv@mail.ru

Сфинголипиды – это класс липидов, являющихся производными алифатических аминок спиртов. Большое содержание веществ этого класса обнаруживается в животных и растительных мембранах, где они выполняют, в основном, структурную функцию. Особенно богата ими нервная ткань. Выделяют три основных типа сфинголипидов: церамиды, содержащие только сфингозин, соединенный ацильной связью с жирной кислотой; цереброзиды – глико сфинголипиды, содержащие церамид с присоединенным моно- или олигосахаридным остатком к гидроксигруппе в первом положении; и ганглиозиды – цереброзиды, имеющие от одного до нескольких остатков сиаловой кислоты в составе углеводной цепи.

Структура соединений этого класса существенно различается между наземными и морскими организмами. В частности, среди представителей класса Asteroidea встречаются цереброзиды, содержащие фитосфингозин с разветвленной углеводородной цепью, необычного строения ганглиозиды, имеющие редкие типы моносахаридных остатков, которые не были обнаружены ранее в ганглиозидах других организмов.

Интерес к сфинголипидам связан не только с их необычным химическим строением, но и с высокой биологической активностью: они ингибируют рост грибов, бактерий и микроводорослей, снижают адгезионную способность бактериальных клеток [1], а также обладают антипролиферативной и цитотоксической активностью в отношении ряда раковых клеточных линий человека [2].

В наших исследованиях мы изучали сфинголипидный состав глубоководной морской звезды *Ceramaster patagonicus*. В результате экстракции и последующей очистки хроматографическими методами была получена серия соединений. Их строение было установлено методами одно- и двухмерной ЯМР спектроскопии, ИЭР масс-спектрометрии высокого разрешения, а также с помощью метанолиза и ацетилирования с последующим ГЖХ-МС анализом полученных продуктов реакций. Абсолютная конфигурация асимметрических центров описана исходя из сходства данных оптического вращения полученных производных с соответствующими литературными данными.

В ходе работы были выделены сфинголипиды двух структурных типов: церамиды и цереброзиды. Во всех выделенных церамидах длинноцепочечным основанием являются остатки Δ^9 -С-21 и Δ^9 -С-23 фитосфингозинов изо-типа. Цереброзиды имели более разнообразные основания, такие как насыщенный С-17 фитосфингозин анти-изо типа, а также ненасыщенные С-22 и С-19 сфингозины нормального и анти-изо типа. Выделенные цереброзиды имели в своем составе остаток β -D-глюкопиранозы. В структуре всех соединений присутствовали 2-гидрокси жирные кислоты нормального типа. Два выделенных цереброзида, офидиациереброзиды С и D, являются известными соединениями, выделенными впервые из морской звезды *Ophidiaster ophidianus*, а также других видов морских звезд.

Ссылки:

1. Bibel D.J., Aly R., Shinefield H.R. Antimicrobial activity of sphingosines // J. Invest. Dermatol. 1992. V. 98(3). P. 269-273.
2. Lin I.L., Chou H.L., Lee J.C., Chen F.W., Fong Y., Chang W.C., Huang H.W., Wu C.Y., Chang W.T., Wang H.M.D., Chiu C.C. // Cancer Cell Int. 2014. V. 14(1). P. 1-7.

Водорастворимые полисахариды из бурой водоросли *Sargassum microcystum*: структурные характеристики и противоопухолевая активность

Р. А. Шкрабов^{1,2}, В. В. Суриц², Р. В. Усольцева², С. П. Ермакова²

¹Кафедра биоорганической химии и биотехнологии,

Дальневосточный федеральный университет

²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,

Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: shkrabov.ral@students.dvfu.ru

К водорастворимым полисахаридам бурых водорослей относятся такие соединения, как фукоиданы и ламинараны. Фукоиданы представляют собой семейство сульфатированных фукозосодержащих гомо- и гетерополисахаридов, обязательным и часто главным компонентом которых являются остатки α -L-фукозы. Ламинараны – полисахариды, состоящие из остатков β -D-глюкопиранозы, соединенных между собой 1,3- и 1,6-связями. Фукоиданы и ламинараны проявляют широкий спектр биологической активности и низкую токсичность по отношению к нормальным клеткам человека, благодаря этому они обладают большим потенциалом для использования в медицине и фармакологии.

Бурая водоросль *S. microcystum* произрастает в прибрежных водах островов Индийского океана, а также морях Вьетнама, Сингапура и Австралии. В литературе отсутствуют данные о получении полисахаридов из этого вида водоросли, поэтому настоящее исследование является новым и актуальным.

Целью данной работы является выделение индивидуальных препаратов водорастворимых полисахаридов из вьетнамской бурой водоросли *S. microcystum*, установление их структурных характеристик, а также исследование противоопухолевой активности фукоидана.

Полисахариды экстрагировали из водоросли раствором разбавленной соляной кислоты, затем разделяли на нейтральный ламинаран и заряженный фукоидан с помощью колоночной хроматографии на гидрофобном носителе Полихром-1. Фукоидан дополнительно очищали от полифенольных соединений и фракционировали методом анионообменной хроматографии на DEAE-Macro Prep. Выходы очищенных ламинарана и фукоидана составили соответственно 0,43% и 0,14% от веса сухой обезжиренной водоросли. Был проведен анализ моносахаридного состава полученных полисахаридов. Показано, что ламинаран представляет собой чистый глюкан, а фукоидан – преимущественно галактофукан (Fuc/Gal/Glc/Xyl = 60/38/1/1). Степень сульфатирования фукоидана составила 24%.

Полученные фракции были исследованы с помощью спектроскопии ЯМР. Было показано, что ламинаран содержит основную цепь из 1,3-связанной β -D-глюкопиранозы с разветвлениями при C6 в виде единичных остатков β -D-глюкопиранозы. Соотношение связей 1,3:1,6 составило 4:1. Фукоидан представляет собой сложный комплексный гетерополисахарид, не содержащий ацетильных групп.

Противоопухолевая активность выделенного фукоидана *in vitro* была изучена на клетках меланомы человека методом мягкого агара. Показано, что исследуемый полисахарид не является токсичным, а также обладает противоопухолевым действием.

Таким образом, настоящее исследование позволило оценить вьетнамскую водоросль *S. microcystum* как источник ламинарана с типичной структурой и сульфатированного галактофукана, обладающего противоопухолевой активностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-53-54003.

Структурное изучение стеллеттинов Q и R - новых изомалабарикановых тритерпеноидов из морской губки *Stelletta* sp.

А. Б. Кожушная^{1,2}, С. А. Колесникова¹, Е. Г. Ляхова¹, А. И. Калиновский¹, Р. С. Попов¹,
Д. В. Бердышев¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН

²Дальневосточный федеральный университет

Электронная почта: Kozhushnaia.AB@mail.ru

Морские губки рода *Stelletta* распространены во всех морях Мирового океана. Из губок *Stelletta* sp. в качестве вторичных метаболитов выделено около 130 соединений, главным образом алкалоидов, терпеноидов, пептидов, липидов и стероидов. Особой группой биологически активных терпеноидов, найденных в тропических образцах губок этого рода, а также в губках родов *Geodia*, *Jaspis* и *Rhabdastrella*, являются изомалабариканы [1]. Они представляют собой *транс-син-транс*-6,6,5-трициклические тритерпеноиды с сопряженной полиеновой системой в боковой цепи, расположенной при C-13, и кето-группой при C-12 [2].

Из вьетнамской губки *Stelletta* sp. нами была выделена серия соединений, в том числе новые изомалабариканы – стеллеттины Q (1) и R (2). Их строение установлено с помощью одно- и двумерных ЯМР экспериментов и методов масс-спектрометрии. Для определения абсолютной стереохимии было проведено сравнение экспериментальных ЭКД кривых с теоретическими кривыми, рассчитанными для возможных стереоизомеров методами квантово-химического моделирования (Рисунок 1). Установлено, что стеллеттины Q (1) и R (2) являются парой 13*Z/E* – изомеров с 15*R*,23*S* абсолютной конфигурацией циклопентеновой группы боковой цепи. Полученные нами новые данные и детальный анализ экспериментальных и расчетных ЭКД кривых для известных 3-кето-аналогов соединений 1 и 2, также выделенных нами, показали 15*R*,23*S* абсолютную конфигурацию боковой цепи в глобостеллетине М вместо ранее сообщенной 15*S*,23*S* [3], 15*S*,23*R* конфигурацию цепи в глобостеллетине N вместо 15*R*,23*R* [3] и подтвердили 15*R*,23*S* стереохимию глобостеллетина К.

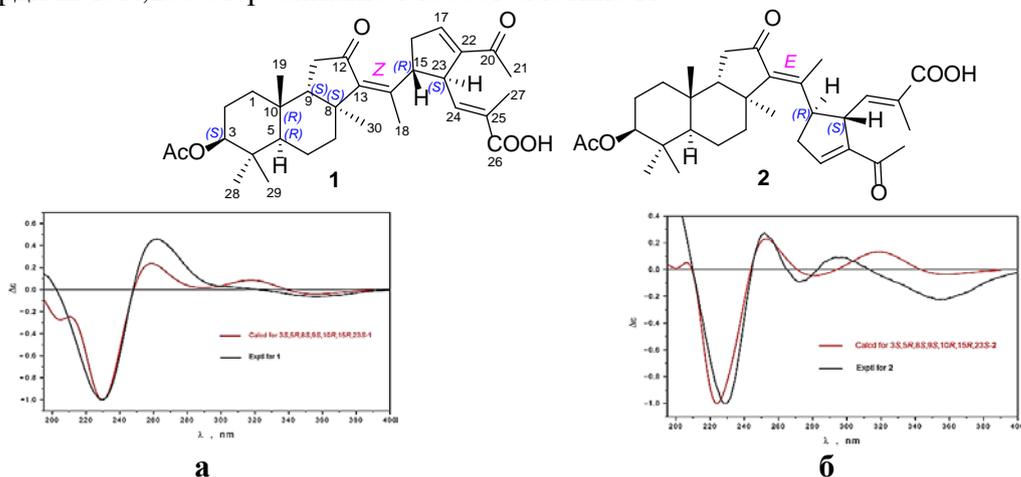


Рисунок 1. Экспериментальные и теоретические ЭКД кривые стеллеттинов Q (а) и R (б)

Исследование проведено с использованием оборудования Дальневосточного центра структурных молекулярных исследований (ЯМР- и масс-спектрометрии) (ЦСМИ ТИБОХ ДВО РАН) при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00040).

Ссылки:

1. Wu Q. et al. // Acta Pharm. Sin. B. 2019. V. 9, №. 2. P. 237 – 257.
2. Tasdemir D. et al. // J. Nat. Prod. 2002. V. 65, №. 65. P. 210 – 214.
3. Li J. et al. // Tetrahedron. 2012. V. 68, №. 2. P. 559 – 565.

α -L-Фукозидазы фукоидан-деградирующего локусаморской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127^T

Н. К. Рубцов^{1,2}, А. С. Сильченко², С. П. Ермакова²

¹*Кафедра биоорганической химии и биотехнологии,*

Дальневосточный федеральный университет

²*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,*

Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: rubtsov.nk@yandex.ru

Ферменты – неотъемлемая часть современной гликобиологии. Использование арсенала охарактеризованных ферментов с различными специфичностями имеет огромный потенциал для определения сложных структур полисахаридов, поскольку существующие на сегодняшний день методы определения структур гликанов являются несовершенными. В то же время существуют полисахариды, для которых еще не найдены или изучены специфичные для них ферменты. Примером таких полисахаридов являются фукоиданы. Фукоиданы – сульфатированные гомо- и гетерополисахариды, состоящие преимущественно из остатков α -L-фукозы, обнаруженные во всех известных на сегодняшний день бурых водорослях [1]. Эти полисахариды представляют огромный интерес для изучения благодаря широкому спектру биологических активностей и низким уровнем токсичности по отношению к нормальным клеткам человека [1, 2]. Всё это открывает огромный потенциал для их применения в биомедицине. Сложная структура этих биополимеров является главной проблемой для установления связи между их структурой и биологической активностью. Применение специфических ферментов может решить эту задачу. Однако эти ферменты слабо изучены. На сегодняшний день описаны только несколько ферментов, участвующих в деполимеризации и десульфатировании фукоиданов [3–5].

Нами представлен биохимический и функциональный анализ четырех рекомбинантных фукозидаз фукоидан-деградирующего кластера морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T. Установлено, что эти ферменты ответственны за гидролитическое отщепление несульфатированных остатков α -L-фукозы от фукоиданов и фукоолигосахаридов во время их деградации морской бактерией. Продемонстрированы некоторые функциональные и биохимические различия между исследуемыми рекомбинантными ферментами. Исследуемые фукозидазы могут быть использованы для направленного секвенирования фрагментов фукоиданов, а также выявления роли боковых ответвлений в биологических эффектах, проявляемых фукоиданами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№21-14-00321).

Ссылки:

1. Usov A.I., Bilan M.I. // Russ. Chem. Rev. 2009. V. 78(8). P. 785-799.
2. Ale M.T., Mikkelsen J.D., Meyer A.S. // Mar. Drugs. 2011. V. 9(10). P. 2106-2130.
3. Kusaykin M.I., Silchenko A.S., Zakharenko A.M., Zvyagintseva T.N. // Glycobiology. 2015. V. 26. P. 3-12.
4. Silchenko A.S., Rasin A.B., Zueva A.O., Kusaykin M.I., Zvyagintseva T.N., Kainovsky A.I., Kurilenko V.V., Ermakova S.P. // *Biomolecules*. 2018. V. 8. №98.
5. Silchenko A.S., Rasin A.B., Zueva A.O., Kusaykin M.I., Zvyagintseva T.N., Rubtsov N.K., Ermakova S.P. // *Carbohydr. Polym.* 2021. V. 271. № 118449.

Противовоспалительная активность синтетических производных 1,4-нафтохинонов, блокирующих пуриnergические рецепторы P2X4 и P2X7-типа

С. А. Козловский¹, Е. А. Пислягин¹, Е. А. Менчинская¹, Е. А. Чингизова¹, Г. Н. Лихацкая¹, Т. Ю. Горпенченко², Л. А. Калужский³, А. С. Иванов³, Ю. Е. Сабуцкий¹, С. Г. Полоник¹, Д. Л. Аминин¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им Г.Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН

²Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии,
Дальневосточное отделение РАН

³ФГБНУ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича
Электронная почта: sergeimerx@gmail.com

Пуриnergические рецепторы P2X4 и P2X7-типа являются трансмембранными неселективными ионными каналами, которые активируются эндогенным АТФ. Данные типы рецепторов экспрессируются в различных типах клеток, включая иммунные клетки и клетки центральной нервной системы [1-2]. Ряд исследований доказывает, что чрезмерная активация или нарушение нормального функционирования P2X4 и P2X7-рецепторов влечет за собой многочисленные патологические состояния организма, связанные с воспалением, болью и деградацией тканей [3-4]. Антагонисты P2X7-рецепторов проявляют терапевтический потенциал при лечении травм головного и спинного мозга, психиатрических и нейродегенеративных заболеваний, а также могут использоваться для профилактики боли, включая хроническую и невропатическую боль [5]. Однако не все известные блокаторы P2X4 и P2X7-рецепторов обладают достаточной селективностью и необходимыми фармакокинетическими характеристиками, что подтверждает актуальность поиска и изучения новых эффективных антагонистов.

Ранее нами была синтезирована серия новых производных 1,4-нафтохинонов и исследовано их действие в качестве антагонистов пуриnergических рецепторов. В ходе исследования была продемонстрирована способность 4 соединений — U-286, U-548, U-556, U-557 — блокировать эффекты, связанные с активацией нативного P2X7-рецептора в нейрональных клетках мышцы Neuro-2a [6]. В продолжение данной работы эти соединения были изучены на макрофагальных клетках RAW-264.7. В результате, было показано, что применение выбранных соединений значительно снижает АТФ-индуцированную продукцию АФК и ингибирует вход ионов Ca^{2+} в клетках RAW 264.7, а также значительно повышает жизнеспособность клеток в условиях токсического действия высоких концентраций АТФ. Методами иммуноферментного анализа была показана способность данных соединений ингибировать АТФ-индуцированный выход провоспалительного цитокина TNF- α , а также активность фермента СОХ-2. Связывание соединения U-556 с P2X4-рецептором было подтверждено методами поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Полученные данные свидетельствуют о возможности использования соединений U-286, U-548, U-556 и U-557 для создания эффективных блокаторов пуриnergических рецепторов P2X4 и P2X7-типов.

Работа поддержана грантом РФФ №19-14-00047.

Ссылки:

1. BoX.et al. // CellTissueRes. 2003. V. 313(2). P. 159-165.
2. Collo G. et al. // Neuropharmacology. 1997. V. 36(9). P. 1277-1283.
3. Antonioli L. et al. // COPHAR. 2019. V. 47. P. 65-74.
4. Savio L.E.B. et al. // Front. Pharmacol. 2018. V. 9.№ 52.
5. Burnstock G., Knight G.E. //Purinergic Signal. 2018. V. 14(1). P. 1-18.
6. Pislyagin E., Kozlovskiy S. et al. // Bioorg. Med. Chem. 2021. V. 31. № 115975.

Применение алгоритма NULA для анализа аминокислотных последовательностей пептидов морской анемоны *Heteractis crispa*

Р. С. Калина, И. Н. Гладких, А. Н. Кветкина, О. В. Синцова, Е. В. Лейченко
*Тихоокеанский институт биоорганической химии им Г.Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН*
Электронная почта: kalinarimma@gmail.com

Алгоритм NULA (Number of Laero and Acevedo), разработанный L.R. Laero и O.E. Acevedo, позволяет оценивать сходство между последовательностями аминокислот и нуклеотидов, не требуя их выравнивания, а также сравнивать содержание и распределение определенных типов аминокислотных остатков или нуклеотидов в анализируемых последовательностях [1]. Алгоритм NULA основан на предложенной К. Gödel идее арифметизации, т.е. замены утверждений о формальной системе, в качестве которой выступает анализируемая последовательность, эквивалентными высказываниями о натуральных числах. Метод NULA позволяет конвертировать аминокислотную последовательность в набор координат (x, y, z), которые однозначно описывают положение каждой последовательности в 3D декартовых координатах, что делает результат максимально наглядным, даже при сравнении десятков высокомолекулярных последовательностей. При этом метод не требует специальных навыков, а необходимая для проведения расчетов информация включает только количество аминокислотных остатков в последовательности, число остатков каждого типа и их порядковые номера [1, 2].

Мы использовали метод NULA для сравнительного анализа аминокислотных последовательностей нейротоксинов, пептидов Кунитц-типа и APETx-подобных пептидов морской анемоны *Heteractis crispa*. Полученные результаты демонстрируют, что алгоритм NULA позволяет эффективно сравнивать гомологичные пептиды и, как сообщалось ранее L. Morales и др., кластеризовать их в соответствии не только со структурой, но и выполняемыми функциями, например способностью модулировать различные ионные каналы [2]. Дополнительным преимуществом данного метода является возможность сравнивать различные структурные классы пептидов, действующие на одну молекулярную мишень, что особенно актуально для пептидов морских анемонов, которые отличаются максимальным структурным разнообразием среди наземных и морских ядовитых организмов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-54-05006.

Ссылки:

1. Laero L.R., Acevedo O.E. // Acta Biotheor. 1999. V. 47. P. 123-128.
2. Morales L., Acevedo O., Martínez M., Gokhman D., Corredor C. // Cent. Eur. J. Biol. 2009. V. 4. P. 41-49.

Актинопорин Hct-S3 морской анемоны *Heteractis crispa* подавляет миграцию опухолевых клеток рака кишечника

А. П. Павленко¹, О. С. Маляренко¹, А. Н. Кветкина¹, С. А. Дышловой^{2,3,4}, Е. В. Лейченко¹

¹*Тихоокеанский институт биоорганической химии им Г.Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН*

²*Отделение онкологии, гематологии и трансплантации костного мозга с отделом
пневмологии, Университетский медицинский центр Гамбург-Эппендорф*

³*Центр рака простаты, Университетская клиника Гамбург-Эппендорф*

⁴*Дальневосточный федеральный университет*

Электронная почта: apavlenko141@gmail.com

Актинопорины – полипептидные токсины морских анемонов, формирующие поры в мембранах клеток, содержащих сфингомиелин. Благодаря цитолитическому действию и высокой стабильности к температуре и протеолитической деградации актинопорины рассматривают в качестве противоопухолевых, антибактериальных и кардиостимулирующих агентов. Особое внимание уделяется созданию иммуноконъюгатов с различными лигандами и их исследованию на опухолевых клетках и паразитах.

В данной работе была изучена цитотоксическая активность актинопорина Hct-S3 (177 а.о.) морской анемоны *Heteractis crispa* на эпидермальных клетках мыши (JB6 C141) и четырех линиях опухолевых клеток, а также его влияние на неопластическую трансформацию и миграцию клеток. Показано, что Hct-S3 снижает жизнеспособность клеток рака кишечника (HT-29), рака молочной железы (MDA-MB-231), меланомы (SK-MEL-28) и JB6 C141 на 50% в концентрации 6,8, 7,3, 8,3 и 8,6 мкМ соответственно. Установлено, что в концентрации 4 мкМ актинопорин ингибирует на 34% неопластическую трансформацию клеток JB6 C141, вызванную эпидермальным фактором роста, и на 47, 37 и 34% – образование колоний клеток HT-29, MDA-MB-231 и SK-MEL-28 соответственно.

Исследовано влияние Hct-S3 на миграцию опухолевых клеток рака кишечника HT-29. Показано, что актинопорин в концентрации 4 мкМ полностью подавляет миграцию раковых клеток. Для выявления предполагаемого механизма антимиграционной активности было оценено влияние Hct-S3 на уровень экспрессии матриксных металлопротеиназ (ММП)-2 и -9, играющих важную роль в инвазии и метастазировании опухолевых клеток. Показано, что актинопорин в концентрации 2 мкМ эффективно ингибирует экспрессию как ММП-2, так и ММП-9. В этой же концентрации Hct-S3 запускал расщепление каспазы-3 и поли(АДФ-рибозы)-полимеразы (PARP), участвующих в индукции апоптоза, а также активировал экспрессию проапоптотического фактора Вах и подавлял экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2.

Таким образом, полученные результаты указывают на высокий потенциал Hct-S3 в качестве противоопухолевого соединения с антимиграционной активностью.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-74-10028.

Синтез природных хиноидных соединений и их аналогов на основе азидопроизводных нафтазарина

Д. Н. Пелагеев^{1,2}, К. Л. Борисова¹, В. Ф. Ануфриев¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН

²Дальневосточный федеральный университет

Электронная почта: pelageev@mail.ru

Органические азиды являются весьма реакционноспособными синтетически полезными реагентами, которые могут быть использованы для препаративного получения широкого ряда соединений, в том числе различных азотсодержащих гетероциклов, таких как карбазолы, фуроксаны, азепины, триазолы, азиридины и др. В то же время химия азидопроизводных нафтазарина (5,8-дигидрокси-1,4-нафтохинона), которые могут быть легко получены из его доступных хлорпроизводных реакцией с азидом натрия в полярной протонной (MeOH) или апротонной (DMCO) среде, изучена недостаточно глубоко [1].

Нами установлено, что нагревание 2,3-дiazидонафтазаринoв **1a-i** в уксусной кислоте приводит к образованию соответствующих производных 5,8-дигидроксиизохинолино-1,3,4(2*H*)-триона **2a-i**, аналогов алкалоида мимозохинона, ранее выделенного из губки *Haliclona cribriculis* (Схема 1) [2]. В тех же условиях 2-азидонафтазаринoв **4a,b** дали производные 1*H*-нафто[2,3-*b*]азиридин-2,7(1*aH*,7*aH*)-диона **5a,b** (Схема 2). Добавление в реакционные смеси воды и минеральной кислоты (серной или метансульфокислоты) приводит к формальному замещению азидо- на гидроксигруппы с образованием соответствующих (поли)гидроксипроизводных **3a-i** (Схема 1) и **6a,b** (Схема 2).

Ранее было установлено, что соединения **2a-i** образуются при взаимодействии спиназаринoв **3a-i** с водным раствором аммиака [3]. Однако описываемая конверсия **1a-i**→**2a-i** оказалась более эффективной. В то же время взаимодействие гидроксинафтазаринoв **6a,b** с водным аммиаком вместо продуктов типа **5a,b** приводило к производным 8-аминоюглона [4].

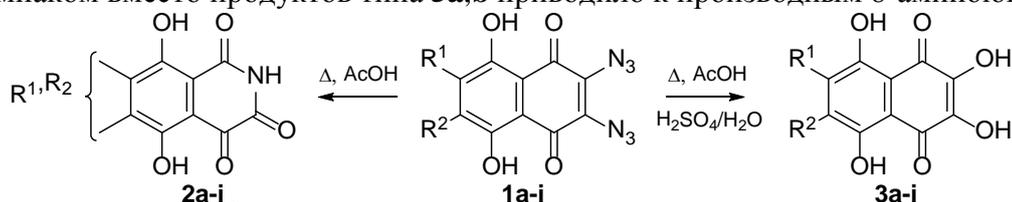


СХЕМА 1. **1,2,3** R₁,R₂: H,H (**a**); Me,Me (**b**); OMe,OMe (**c**); H,Me (**d**); H, Et (**e**); H,OH (**f**); H, OBU(**g**); OH,Me (**h**); OH,Et(**i**)

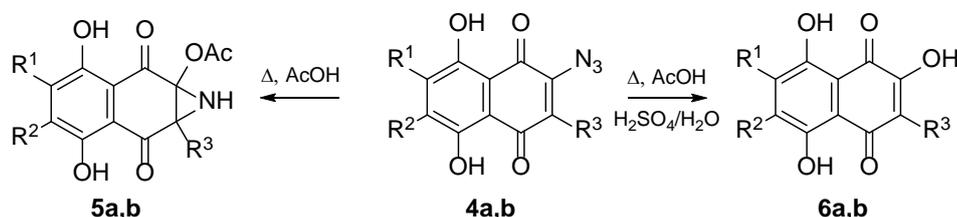


СХЕМА 2. **4,5,6** R₁,R₂,R₃: H,H,H (**a**); Me,Me,Me (**b**)

Ссылки:

1. Pokhilo N.D., Shuvalova M.I., Lebedko M.V., Sopelnyak G.I., Yakubovskaya A.Ya., Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Anufriev V.Ph. // J. Nat. Prod. 2006. V. 69. P. 1125-1129.
2. Parameswaran P.S., Naik C.G., Kamat S.Y., Pramanik B.N. // Ind. J. Chem. B. 1998. V. 37. P. 1258-1263.
3. Борисова К.Л., Мельман Г.И., Денисенко В.А., Глазунов В.П., Ануфриев В.Ф. // Изв. АН. Сер. хим. 2012. С. 613-619.
4. Мельман (Сопельняк) Г.И., Мищенко Н.П., Денисенко В.А., Бердышев Д.В., Глазунов В.П., Ануфриев В.Ф. // Журн. орган. Химии. 2009. Т. 45. С. 44-50.

Получение наночастиц на основе фукоиданов из *Fucus evanescens*

А. Б. Расин¹, Н. М. Шевченко¹, А. С. Сильченко¹, М. И. Кусайкин¹, Г. Н. Лихацкая¹,
Т. Н. Звягинцева¹, С. П. Ермакова¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН
Электронная почта: abrus_54@mail.ru

Наночастицы были созданы с использованием двух различных фукоиданов, выделенных из бурых водорослей *Fucus evanescens*. Одним из них был регулярный фукоидан **FeF2**, впервые полученный из водоросли, собранной на репродуктивной стадии роста, с использованием стандартных методов экстракции без дополнительных модификаций. Методом спектроскопии ЯМР было установлено, что его структура состоит из повторяющегося фрагмента $\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2,4\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow$. Структура другого фукоидана **FeF1** на 55% состояла из такого же фрагмента, но также включала продолжительные последовательности остатков $\alpha\text{-L-}$ фукопиранозы, сульфатированных только при C2. Молекулярная масса регулярного фукоидана составляла 340 кДа, нерегулярного – 123 кДа.

С ростом содержания фукоидана размер наночастиц увеличивался, а дзета-потенциал смещался из области положительных значений в область отрицательных (Рисунок 1). Использование регулярного фукоидана из *F. evanescens* с большей молекулярной массой привело к образованию более крупных наночастиц, чем использование менее регулярного фукоидана с меньшей молекулярной массой. Были построены трёхмерные модели отрезков регулярного фукоидана и хитозана. Их молекулярный докинг показал, что внешнюю часть комплекса мог образовывать и тот и другой полимер в зависимости от соотношения. Термодинамические параметры процесса связывания фукоидана и хитозана указывали на то, что во время взаимодействия происходят значительные конформационные изменения их молекул. Структура и молекулярная масса фукоидана из *F. evanescens* оказывала существенное влияние на процесс его связывания с хитозаном.

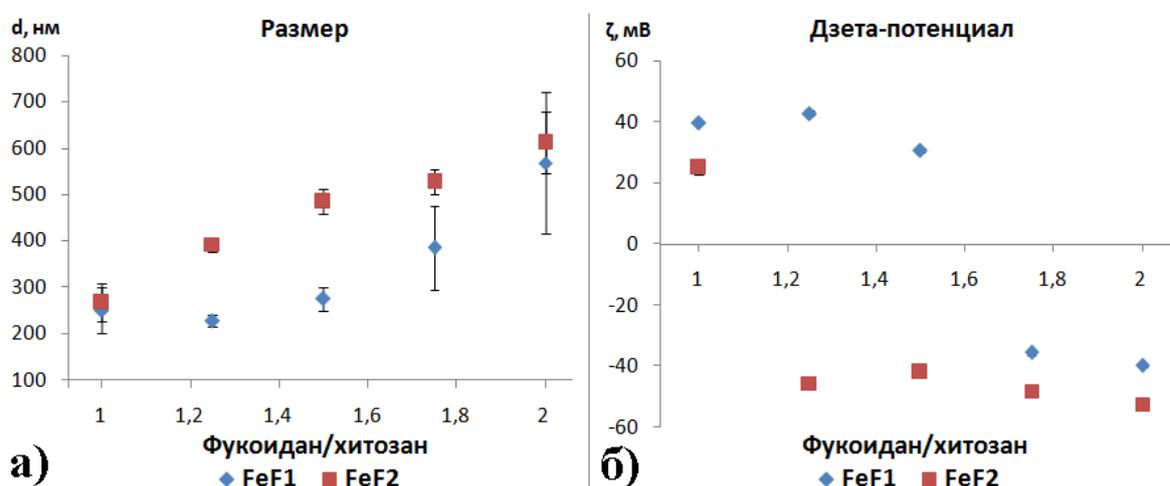


Рисунок 1. Влияние соотношения масс фукоидана и хитозана на размер (а) и дзета-потенциал (б) полиэлектродных наноконплексов, созданных с использованием фукоиданов **FeF2** и **FeF1**, перерастворённых в воде

Сравнительный анализ структуры и механизма действия эндо-(1→3)-β-D-глюканаз морских бактерий рода *Formosa*

А. А. Белик, А. Б. Расин, М. И. Кусайкин, С. П. Ермакова
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН
Электронная почта: belik_a_a@mail.ru

Способность ферментов катализировать реакцию трансгликозилирования является типичной реакцией гликозидгидролаз, сохраняющих конфигурацию аномерного атома углерода. Бактериальные эндо-(1→3)-β-D-глюканазы обычно имеют более простые первичные и пространственные структуры, чем аналогичные ферменты беспозвоночных, обладают гораздо большей стабильностью и, следовательно, представляют собой потенциальный источник трансгликозилирующих ферментов, применимых в биотехнологии.

Морские бактерии *Formosa algae* и *F. agariphila* обитают на талломах бурых водорослей и встречаются в разных регионах Мирового океана.

Нами был проведен сравнительный анализ первичных структур и каталитических свойств рекомбинантных эндо-(1→3)-β-D-глюканаз из морских бактерий *F. algae* КММ 3553 (GFA) и *F. agariphila* КММ 3901 (GFAG). Оба фермента имели одинаковую молекулярную массу 61 кДа, температурный оптимум 45°C и сопоставимые диапазоны термостабильности и Km. По данным ¹H ЯМР оба фермента относятся к типу эндо-(1→3)-β-D-глюканаз, сохраняющих конфигурацию аномерного атома углерода. В то время как набор продуктов гидролиза ламинаранас помощью GFA был постоянен в диапазоне pH 4–9, преобладающие продукты гидролиза ламинаранас помощью GFAG варьировались: ламинарибиоза преобладала при pH 5–6, ламинарипентаоза – при pH 4 и 7–8, ламинаритриоза – при pH 9. Действие на смесь ламинарана и 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкозида указало на наличие трансгликозилирующей активности у GFA и ее отсутствие у GFAG. В то время как GFA продуцировала продукты трансгликозилирования со степенью полимеризации 2–10 (преимущественно 3м4), GFAG не катализировала трансгликозилирование ни при каких значениях pH.

Работа выполнена по гранту Министерства образования и науки РФ №13.1902.21.0012 (номер соглашения: 075-15-2020-796).

Структурные характеристики лектинов гемолимфы двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*

Т. О. Мизгина^{1,2}, И. В. Чикаловец^{1,2}, В. И. Молчанова², О. В. Черников²
¹Дальневосточный федеральный университет

² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: tanya.tasha@mail.ru

Лектины – белки или гликопротеины, специфически и обратимо связывающие моно- и олигосахариды, не вызывая их химического превращения. Повсеместное распространение лектинов в природе и их способность различать близкие по структуре углеводы в растворе и на клеточной поверхности обеспечивают неослабевающий интерес исследователей к изучению их биологических функций. На данный момент лектины обнаружены у организмов, находящихся на разных ступенях эволюции, начиная от наиболее примитивных форм жизни – вирусов и бактерий – до представителей высших позвоночных, что свидетельствует об универсальности механизмов белок-углеводного распознавания и его важной роли в эволюционных процессах.

Ранее в лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН из гемолимфы двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis* были выделены несколько лектинов: GYL – Ca²⁺-зависимый муцин-специфичный лектин и GYLman – Ca²⁺-зависимый лектин, проявляющий аффинность к высокоразветвленным гомополисахаридам – маннанам [1].

Исследование пространственной организации GYL и GYLman проводилось методом спектроскопии кругового дихроизма (КД). Для GYLman (рН 8,5, 25°C) спектр КД в дальней УФ-области (190–260 нм) показал широкую отрицательную полосу с центром около 225 нм. Спектр КД нативного GYL (рН 8,5, 25°C) в дальней УФ-области (190–260 нм) показал широкую отрицательную полосу с центром около 215 нм и положительный максимум около 192 нм. Выраженная тонкая структура КД спектров указывает на асимметрию окружения ароматических остатков, их жесткую фиксацию в молекуле и свидетельствует о компактной третичной организации лектина.

Содержание элементов вторичной структуры белков рассчитывали с помощью пакета программ CD Pro, используя метод Sreerama, результаты расчетов представлены в таблице 1 [2].

Таблица 1– Содержание элементов вторичной структуры лектинов, %

п/п	Образец	α-спираль			β-структура			β-изгиб	неупорядоченная структура
		I	II	III	I	II	III		
1.	GYL	0,1	4,6	4,7	28,3	13,7	42,0	20,7	32,6
2.	GYLman	0,2	3,9	4,1	30,8	14,4	45,2	19,4	31,3

Как видно из таблицы 1, оба лектина являются β-структурированными белками, что характерно для лектинов двустворчатых моллюсков, например, вторичная структура лектина мидии *Crenomytilus grayanus* (CGL) состоит из 43,1% β-структур и 4,3% α-спиралей, лектина мидии *Mytilus californianus* (MCL) состоит из 60,7% β-структур и 6,2% α-спиралей, а лектина мидии *Mytilus trossulus* (MTL) состоит из 61,4% β-структур и 6% α-спиралей.

Ссылки:

1. Mizgina T., Chikalovets I., Molchanova V., Kokoulin M., Filshtein A., Sidorin E., Chernikov O. // Russ J Bioorg Chem. 2020. V. 46. P. 1187-1197.
2. Sreerama N., Woody R. // Anal. Biochem. 2000. V. 287. P. 252-260.

Использованием методов гибкого межмолекулярного взаимодействия *in silico* для оценки взаимодействия потенциальных лигандов с TRPM8

П. Д. Тимкин, Э. А. Тимофеев, Е. А. Бородин
ФГБОУ ВО Амурская государственная медицинская академия Минздрава России
Электронная почта: timkin.pasha@mail.ru

TRPM8 – представитель обширного семейства TRP-белков, задействованных в сенсорной физиологии. Белок является неселективным катионным каналом, участвует в восприятии низких температур и имеет непосредственное отношение к формированию бронхоспазма при действии холода на организм [1]. Имеются косвенные указания на ряд веществ, способных взаимодействовать с TRPM8. Классический межмолекулярный докинг, например, с помощью софта AutoDock, позволяет выявить образование комплексов лигандов с белком, оценить их сродство, но не может ответить на вопрос, являются ли они агонистами или антагонистами, что представляет несомненный интерес [2]. В то же время существуют методы гибкого межмолекулярного взаимодействия *in silico*, позволяющие решить эту задачу. В настоящей работе для решения подобной задачи применительно к лигандам TRPM8 мы воспользовались софтом Galaxy7TM [3]. Алгоритм действий представлен на схеме (Рисунок 1).



Рисунок 1. Блок-схема с пошаговым описанием действий для решения поставленной задачи

Для исследования были отобраны 50 потенциальных лигандов, из которых только 9 стыковались с TRPM8 согласно методу жесткого докинга AutoDock. Произвести гибкий докинг удалось только с 7 кандидатами, которые стыкуются с аминокислотами, расположенными рядом с тирозином 745 (Y745) – критической точкой связывания агонистов TRPM8, и тем самым блокируют доступ других лигандов к Y745. Следовательно, они выполняют роль антагонистов TRPM8 и препятствуют работе ионного канала.

Ссылки:

1. Liu Y., Mikrani R., He Y., Baig M.M.F.A., Abbas M., Naveed M., Tang M., Zhang Q., Li C., Zhou X. // Eur. J. Pharmacol. 2020. V. 882. № 173312.
2. Borodin E.A., Leusova N.Y., Chupalov A.P., Timkin P.D., Timofeev E.A., Kolosov V.P., Perelman J.M. // Int. J. Pharm. Phytopharm. Res. 2021. V.11. P. 69-73.
3. <http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=7TM> – A web server for protein structure prediction, refinement, and related methods

Биоинформатический анализ модифицированных лигандов для рецептора TRPM8

Э. А. Тимофеев, П. Д. Тимкин, Е. А. Бородин
 ФГБОУ ВО Амурская государственная медицинская академия Минздрава России
 Электронная почта: smileket@inbox.ru

В работе предпринята попытка модификации потенциальных лигандов к TRPM8 с целью увеличения их аффинности. Модификация осуществлялась с помощью комплекса молекулярного инструментария для работы с химическими соединениями *in silico* PYMOL [1], а оценка аффинности с использованием софта AutoDock [2]. Лиганды к TRPM8 модифицировали путем добавления атомов фтора и молекулы циклогексана (Табл. 1).

Табл. 1. Минимальная энергия связи лигандов с TRPM8

Лиганды	Минимальная энергия связи	Модифицированные лиганды	Модификация	Минимальная энергия связи
AMG-333	-2.82	AMG-333.M	фтор	-2.95
AMTB	-3.66	AMTB.M	фтор	-3.84
Borneol	-3.58	Borneol.M	циклогексан	-4.33
Cannabidivarin	-3.40	Cannabidivarin.M	циклогексан	-3.93
Cubebol	-4.43	Cubebol.M	циклогексан	-5.29
Eucaliptol	-3.44	Eucaliptol.M	циклогексан	-4.89
Riluzole	-2.90	Riluzole.M	циклогексан	-3.81
Riparin	-3.75	Riparin.M	циклогексан	-3.76
Rotundifolone	-3.39	Rotundifolone.M	циклогексан	-4.76

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении аффинности вследствие добавления фтора или циклогексана.

Ссылки:

1. <http://autodock.scripps.edu/> – molecular docking software
2. <https://pymol.org/2/> – chemical modification toolkit

Стендовые доклады

Модификация лентивирусных векторных конструкций для флуоресцентного маркирования индуцированной гиперэкспрессии мутантных генов *IDH1* и *TP53*

И. Н. Бакланов, Н. В. Гончаров

Школа Биомедицины, Лаборатория биомедицинских клеточных технологий,

Дальневосточный федеральный университет

Электронная почта: baklanov.in@students.dvfu.ru

Опухоли головного мозга – это одни из самых опасных онкологических заболеваний, характеризующиеся высокой смертностью пациентов ввиду особенности их локализации и частого инвазивного роста. Большая часть новообразований ЦНС происходит из злокачественных опухолей, расположенных за пределами центральной нервной системы, благодаря их способности метастазировать. Наиболее распространенными типами первичных опухолей головного мозга являются глиомы и менингиомы. Несмотря на их распространенность, а также гистологические и молекулярные характеристики, определяемые в соответствии с классификацией ВОЗ от 2016 года, до сих пор остается малоизученным влияние ключевых генов и их онкоассоциированных вариантов *IDH1* и *TP53* на молекулярный профиль клеток глиом.

Точечные мутации в гене изоцитратдегидрогеназы типа 1 часто встречаются в глиомах, при этом некоторые онкогенные варианты *IDH1* являются одним из залогов относительно успешной химиотерапии темозоломидом и, как следствие, благоприятного исхода для пациентов. К ним относится вариант гена *IDH1* R132H. В то же время мутантные варианты гена *TP53* R248Q чаще ассоциированы с низкой выживаемостью пациентов, но каких-либо точных утверждений о их роли в глиомах нет. Несмотря на то, что данные мутации довольно часты и оказывают глубокое влияние на экспрессию других регуляторных генов, эта мутационная комбинация еще никогда не изучалась. Хотя существуют исследования, показывающие взаимодействие мутации в гене *IDH1* и потерю антионкогенной функции *TP53* (*TP53* loss of function) при глиомагенезе, очевидно, что потеря антионкогенной и усиление проонкогенной функций могут активировать различные механизмы выживания клеток глиом.

Для изучения влияния мутационной комбинации в генах *IDH1* и *TP53* на молекулярный профиль клеток глиом нами была разработана генетическая конструкция для сборки лентивирусных частиц с системой флуоресцентной индикации мутантных аллелей *IDH1* R132H и *TP53* R248Q. Данная конструкция позволяет гиперэкспрессировать мутантные гены *IDH1* и *TP53* и маркировать фолдинг белков с помощью флуоресцентных репортеров. Созданные лентивирусные векторы позволяют моделировать совместное действие мутантных аллелей в первичных опухолевых клетках глиом и оценивать изменения их молекулярного профиля.

Ссылки

1. Ohgaki H., Kleihues P. // Acta Neuropathol. 2005. V. 109. P. 93-108.
2. Zong H., Parada L.F., Baker S.J. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2015. V. 7. P. 1-13.
3. Zanotto-Filho A., Braganhol E., Klafke K., Figueiró F., Terra S.R., Paludo F.J., Morrone M., Bristot I.J., Battastini A.M., Forcelin C.M., Bishop A.J.R., Gelain D.P., Moreira J.C.F. // Cancer Lett. 2015. V. 358. P. 220-231.
4. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H., Wiestler O.D., Kleihues P., Ellison D.W. // Acta Neuropathol. 2016. V. 131. P. 803-820.

Бета-кетоиминаты дифторида бора: синтез, кристаллизационно-индуцированная и дуальная флуоресценция

Г. О. Третьякова^{1,2}, Е. В. Федоренко², И. В. Свистунова¹, А. Г. Мирочник²

¹ Дальневосточный федеральный университет

² Институт Химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: tretyakova.go@dvfu.ru

Важным классом органических люминофоров являются β-кетоиминаты дифторида бора благодаря способности к агрегационно- и кристаллизационно-индуцированной эмиссии [1]. Кристаллизационно-индуцированная эмиссия является важным феноменом, позволяющим преодолеть процессы концентрационного тушения и получить перспективные твердотельные люминофоры, которые могут быть использованы в качестве люминесцентных сенсоров и смарт-материалов [2, 3]. Способность бета-кетоиминатов дифторида бора у дуальной люминесценции делает этот класс соединений перспективным для создания функционализированных оптических материалов, люминесцентных устройств и устройств для биовизуализации [4].

Проведен синтез и сравнительный анализ люминесцентных свойств β-кетоиминатов дифторида бора и их кислородсодержащих аналогов методами стационарной и время-разрешенной спектроскопии и квантово-химического моделирования.

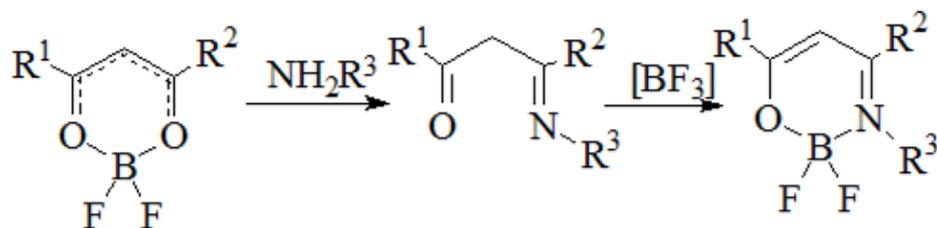


Рисунок 1. Схема синтеза бета-кетоиминатов дифторида бора

Установлена способность ряда бета-кетоиминатов дифторида бора с ароматическими заместителями в α-положении хелатного цикла и небольшими заместителями у атома азота к кристаллизационно-индуцированной эмиссии, обусловленная блокировкой безызлучательных переходов в результате затормаживания вращения ароматического заместителя. Установлена зависимость квантового выхода люминесценции кристаллов от характера заместителя у атома азота. Показана способность бета-кетоиминатов дифторида бора в растворах к дуальной эмиссии.

Ссылки:

1. Zhao J., Peng J., Chen P., Wang H., Xue P., Lu R. // *Dyes Pigments*. 2018. V. 149. P. 276-283.
2. Mei J., Hong Y., Lam J.W.Y., Qin A., Tang Y., Tang B.Z. // *Adv. Mater.* 2014. V. 26. P. 5429-5479.
3. Hong Y., Lam J.W.Y., Tang B.Z. // *Chem. Commun.* 2009. P. 4332-4353.
4. Gui R., Jin H., Bu X., Fu Y., Wang Z., Liu Q. // *Coord. Chem. Rev.* 2019. V. 383. P. 82-103

Поиск новых лектинов морских глубоководных бактерий *Idiomarina abyssalis* КММ 227Т и *Idiomarina zobellii* КММ 231Т

Д. В. Шеховцева¹, А. П. Фильштейн², И. В. Чикаловец², Л. А. Романенко², М. С. Кокоулин²,
О. В. Черников²

¹Дальневосточный федеральный университет

²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,

Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: shekhovtceva.dvl@students.dvfu.ru

Лектины бактерий играют важную роль в бактериальной вирулентности через взаимодействие лектинов с углеводными фрагментами клеток-хозяев, что является важным фактором распознавания и адгезии [1]. Известно, что некоторые лектины бактерий проявляют сильную анти-ВИЧ активность *in vitro* [2]. В настоящее время лектины бактерий являются перспективными кандидатами лекарственных средств нового поколения [3].

Штаммы бактерий *I. abyssalis* КММ 227Т и *I. zobellii* КММ 231Т были выделены из образцов морской воды, собранных в северо-западной части акватории Тихого океана на глубине 4000–5000 м, и являются частью бактериальной коллекции ТИБОХ ДВО РАН. С целью установления наличия лектинов в этих бактериях были получены экстракты методами ультразвуковой обработки и суспендирования шприцем с последующей заморозкой и разморозкой бактериальной массы. Далее проводили сравнительный анализ полученных экстрактов обеих бактерий, определяя гемагглютинирующую активность в присутствии и отсутствии ионов металла и уровень белка методом Лоури. Лучшим способом экстрагирования оказалось суспендирование с последующей термообработкой. Установлено, что в экстрактах бактерий присутствуют Ca^{2+} -зависимые лектины, проявляющие специфичность к гликопротеинам (фетуин (Fet) и муцин желудка свиньи соответственно (PSM)), содержащим О-связанные углеводные цепи муцинового типа с остатками Gal и GalNAc.

Для определения предварительных молекулярных масс лектинов был проведен электрофорез в ПААГ с последующим электроблоттингом. В качестве конъюгатов для окраски белковых полос на нитроцеллюлозной мембране после электроблоттинга были использованы специфичные гликопротеины Fet-ПХ и PSM-ПХ. В результате показано, что в экстракте бактерии *I. zobellii* наблюдаются лектины с молекулярными массами около 20, 40 и 80 кДа; возможно, это олигомеры одного белка, а белковая полоса около 55 кДа, вероятно, соответствует еще одному лектину. Что касается экстракта бактерии *I. abyssalis*, то белковые полосы около 26, 55 и 110 кДа – тоже олигомеры одного лектина, а молекулярные массы около 55 и 72 кДа относятся к еще двум сопутствующим лектинам.

Исходя из полученных данных, дальнейшее выделение и очистку лектинов из экстрактов бактерий *I. zobellii* и *I. abyssalis* будем проводить на Fet-агарозе и PSM-сефарозе соответственно, используя в обоих случаях элюирующий буфер, содержащий галактозу.

Ссылки:

1. Lindhorst T.K. // RSC Polymer Chemistry Series. 2015. № 15. P. 1-16.
2. Huskens D., Ferir G., Vermeire K., Kehr J.C., Balzarini J., Dittmann E., Schols D. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 24845-24854.
3. Podgorskii V.S., Kovalenko E.A., Karpova I.S., Sashchuk E.V., Get'man E.I. // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. V. 50. P. 228-234.

Новый лектин из мантии двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*

Т. А. Буланова¹, Т. О. Мизгина^{1,2}, И. В. Чикаловец^{1,2}, В. И. Молчанова², О. В. Черников²

¹Дальневосточный федеральный университет

² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,

Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: tanya.tasha@mail.ru

Морские беспозвоночные в течении последних нескольких десятилетий являются источником новых биологически активных веществ для создания лекарственных препаратов. Лектины (углевод-связывающие белки) принимают участие во многих биологических процессах, таких как оплодотворение, эмбриогенез, миграция клеток, регенерация тканей, иммунитет и т.д., а биологическая значимость лектинов определяется значимостью их лигандов – углеводов. Поиск, выделение, определение углеводной специфичности и физико-химических характеристик лектинов морских беспозвоночных является одной из актуальных задач современной науки.

На морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН методом гемагглютинации (ГА) эритроцитов был проведен скрининг экстрактов мантии двустворчатых моллюсков залива Петра Великого (бухты Троица). При проведении реакции ГА использовались эритроциты с разным углеводным профилем (кроличьи эритроциты и человеческие эритроциты первой и второй групп крови).

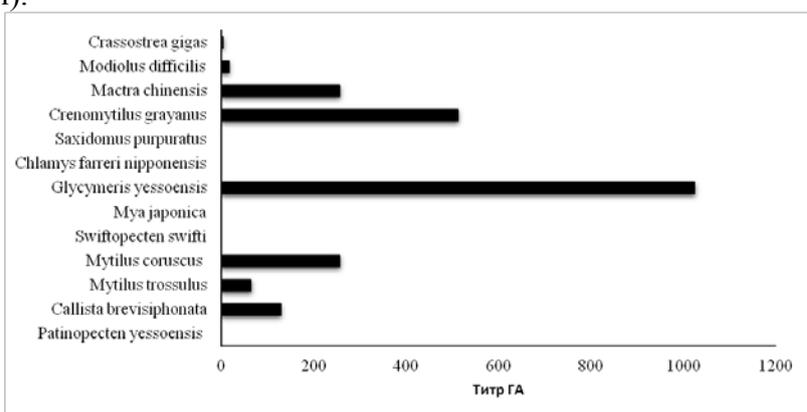


Рисунок 1. Титр ГА экстрактов мантии двустворчатых моллюсков с кроличьими эритроцитами

Как видно из рисунка, наибольший титр ГА обнаружен в гемолимфе широко распространенного тихоокеанского вида двустворчатых моллюсков *G. yessoensis* с кроличьими эритроцитами, в связи с чем данный вид был выбран для дальнейших исследований.

Использование метода ингибирования ГА в присутствии натриевой соли ЭДТА показало, что основной вклад в гемагглютинирующую активность экстракта мантии вносит металлозависимый лектин. При изучении углеводной специфичности лектинов экстракта реакцией ингибирования ГА различными моносахаридами и гликопротеинами выявлена преобладающая активность гемагглютининнов с особым предпочтением к Gal и гликопротеину муцинового типа PSM. Из литературных данных известно, что муцин-специфичные лектины демонстрируют противоопухолевую и иммуномодулирующую активность, это делает их перспективными объектами для биомедицинских исследований.

Полученные данные позволяют предположить, что дальнейшее выделение муцин-специфичного лектина в гомогенном состоянии из экстракта мантии двустворчатого моллюска будет проводиться методом аффинной хроматографии на сорбенте, содержащем PSM.

Генетический состав половых хромосом заборной малахитовой игуаны (*Sceloporus malachiticus*, Iguania, Squamata)

К. В. Тишак^{1,2}, А. П. Лисачев³, С. А. Романенко², А. С. Молодцева², Д. Ю. Прокопов²,
В. А. Трифонов^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет

²Институт молекулярной и клеточной биологии, Сибирское отделение РАН,

³Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (X-BIO) ТюмГУ

Электронная почта: k.tishakova@g.nsu.ru

У большинства позвоночных животных половые хромосомы формируются на основе аутосом. Поэтому генетический состав половых хромосом может существенно различаться между представителями разных линий позвоночных. До сих пор остается неясным, по каким причинам некоторые аутосомные пары становятся половыми хромосомами, какие эволюционные силы на это влияют и можно ли выделить синтенные группы генов, которые вовлекаются в формирование половых чаще, чем остальные.

Чешуйчатые рептилии являются интересными объектами для изучения данной проблемы, поскольку для них характерно удивительное разнообразие систем определения пола: в рамках крупных семейств могут встречаться виды как со средовым определением пола, так и генетическим, включая половые хромосомы систем XY и ZW разной степени вырожденности. В то же время среди позвоночных животных чешуйчатые рептилии являются наименее изученными объектами на уровне геномных исследований.

В данной работе мы исследовали генетический состав половых хромосом у заборной малахитовой игуаны (*Sceloporus malachiticus*, Pleurodonta, Iguania) с помощью метода ChromSeq, основанного на секвенировании специфичных хромосомных библиотек и сравнении полученных последовательностей с референсным геномом каролинского анолиса (*Anolis carolinensis*, ACA). Результаты сравнительного анализа показали, что половые хромосомы заборной игуаны содержат синтенные блоки генов, гомологичные ACAХ, ACA11, ACA16, ACA17, ACA18. Ранее данные группы сцепления уже описывались в составе половых хромосом как чешуйчатых рептилий, так и других линий позвоночных животных. Особого внимания заслуживают синтенные группы, соответствующие ACA11 и ACA18, поскольку ACA11 входит в состав половых хромосом плацентарных млекопитающих и содержит ген *SOX3*, а синтенная группа ACA18 содержит ген *AMH* и описана в составе половых хромосом у однопроходных, варанов, некоторых амфибий и рыб.

Таким образом, половые хромосомы заборных игуан содержат в своем составе синтенные группы генов, которые встречаются в составе половых хромосом как у чешуйчатых рептилий, так и у других линий позвоночных. Дополнительные исследования генетического состава половых хромосом у других линий чешуйчатых рептилий позволят определить, действительно ли данные синтенные группы вовлекаются в формирование половых хромосом чаще, чем остальные.

Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ (№19-54-26017) и гранта Министерства науки и высшего образования РФ №2019-0546 (FSUS-2020-0040).

Кластеризация липидов в модельных биологических мембранах по данным двойного электрон-электронного резонанса, влияние холестерина

А. С. Сморгина¹, Е. А. Гольшева¹, С. А. Дзюба^{1,2}

¹Институт химической кинетики и горения, Сибирское отделение РАН

²Новосибирский государственный университет

Электронная почта: anna.smor.mr@gmail.com

Биологическая мембрана имеет важное значение в функционировании клетки, отделяя вещество клетки от окружающей среды и выполняя ряд других функций. В состав мембранного бислоя входят также свободные жирные кислоты, которые влияют на текучесть мембраны, служат источником структурных компонентов, участвуют в липидном метаболизме и т.д.

Холестерин присутствует в клеточных мембранах всех животных, включая человека. Он обеспечивает избирательную проницаемость клеточной мембраны, оказывает регулирующее влияние на состояние мембраны, а также на активность связанных с ней ферментов. Роль холестерина в мембране выяснена еще не до конца, но известно, что нарушение его метаболизма приводит к ряду серьезных заболеваний.

Считается, что липидные бислои имеют гетерогенную структуру в нанометровой шкале расстояний. Методы импульсного двойного резонанса (PELDOR) – разновидности спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) – чувствительны как раз к таким расстояниям, что делает их перспективными для изучения гетерогенности бислоев (латеральной кластеризации липидов в них). Метод PELDOR может дать информацию о количестве и пространственном положении меток в группе.

В данной работе изучалась кластеризация стеариновой кислоты – аналога свободных жирных кислот – в модельных синтетических мембранах, а также влияние холестерина на эту кластеризацию. Модельные мембраны были приготовлены либо на основе липида 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (POPC), либо смеси 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) и 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DOPC). Стеариновые кислоты содержали спиновую метку в 5-м либо в 16-м положении атома углерода ацильного остатка.

Полученные данные показали, что стеариновые кислоты собираются в латеральные кластеры с характерным межмолекулярным расстоянием в них ~ 2 нм. При средней концентрации $\chi > 4$ мол.% эти кластеры исчезают из-за их перекрытия. При добавлении холестерина кластеры частично растворяются (при низких $\chi < 1$ мол. %), а также сами по себе становятся гетерогенными (при больших χ). Также было обнаружено, что молекулы стеариновой кислоты в бислоях разного состава погружаются на разную относительную глубину: в бислое POPC спиновые метки распределены во всех трех пространственных измерениях, в то время как в бислое DOPC/DPPC их распределение близко к двумерному.

Найдено также, что при больших χ возникает ориентационная корреляция молекул стеариновой кислоты, что может быть объяснено стерическими ограничениями и большим количеством взаимодействующих молекул.

Спектры обычного ЭПР при комнатной температуре также подтверждают кластеризацию, обнаруженную методом PELDOR: наблюдаются значительные эффекты торможения движения при переходе от малых концентраций к большим.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 21-13-00025.

Воздействие сверхэкспрессии генов стильбен синтаз *VaSTS10c* и *VaSTS10d* на устойчивость к абиотическим стрессам растений *Arabidopsis thaliana*

В. В. Волконская^{1,2}, З. В. Огнева¹, К. В. Киселев¹

¹ФНИЦ Биоразнообразия, Дальневосточное отделение РАН

²Дальневосточный федеральный университет

Электронная почта: volkonskaia.vv@students.dvfu.ru

Изучение молекулярно-генетических механизмов формирования устойчивости растений к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды актуально на сегодняшний день для предотвращения низкой урожайности сельскохозяйственных культур. Установлено, что избыточная экспрессия различных генов стильбен синтаз (*STS*) *Vitis amurensis* (*VaSTS*), а именно *VaSTS10c* и *VaSTS10d* улучшает продукцию стильбенов в культуре клеток *V. amurensis* [1]. Эти данные указывают на то, что избыточная экспрессия генов *VaSTS* положительно влияет на уровни содержания стильбенов в культурах клеток дикого винограда. Известно, что стильбены действуют как фитоалексины, как растительные защитные вещества низкомолекулярного синтеза в ответ на микробные патогены и быстро накапливаются в зонах заражения [2].

На данный момент в исследованиях учёных существуют некоторые противоречивые данные по поводу содержания стильбенов и стрессоустойчивости трансгенных растений, поэтому мы решили получить трансгенные растения *Arabidopsis thaliana* с использованием новых последовательностей генов *VaSTS10c* и *VaSTS10d*, не изученных в других работах ранее, и исследовать содержание стильбенов и толерантность к абиотическим стрессам в этом растении [3].

С помощью агробактериальной трансформации соцветий растений были получены несколько независимо трансформированных гомозиготных трансгенных линий арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *VaSTS10c* и *VaSTS10d*. Далее исследовали устойчивость полученных растений к различным абиотическим стрессам: низкой и высокой температуре, засухе, ультрафиолетовому облучению и засолению почвы.

Нами было показано, что сверхэкспрессия гена *VaSTS10d* положительно влияла на устойчивость растений арабидопсиса *A. thaliana* к высокой солёности, высокотемпературному и ультрафиолетовому (УФ-С) стрессу, но достоверное положительное действие наблюдалось только в одной из трех полученных трансгенных линиях *A. thaliana*. Сверхэкспрессия гена *VaSTS10c* положительно влияла на устойчивость растений арабидопсиса *A. thaliana* к засухе, низкотемпературному и ультрафиолетовому (УФ-С и УФ-В) стрессам. Наибольшая устойчивость была отмечена для УФ-В и УФ-С, потому что устойчивы были 2 из 3-х (УФ-В) и 3 из 3-х (УФ-С) использованных линий арабидопсиса, сверхэкспрессирующих ген *VaSTS10c*.

Таким образом, нами получены новые данные о функционировании генов стильбен синтаз из винограда, генов *VaSTS10c* и *VaSTS10d*. Эти данные могут быть далее использованы для получения сельскохозяйственных растений с улучшенными характеристиками устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (19-316-90004).

Ссылки:

1. Aleynova O.A., Grigorichuk V.P., Dubrovina A.S., Robin V.G., Kiselev K.V. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2016. V. 125. P.329-339.
2. Ahuja I., Kissen R., Bones A.M. // Trends Plant Sci. 2012. V. 17. P.73-90.
3. Dubrovina A.S., Kiselev K.V. // Planta. 2019. V. 346. P.597-623.

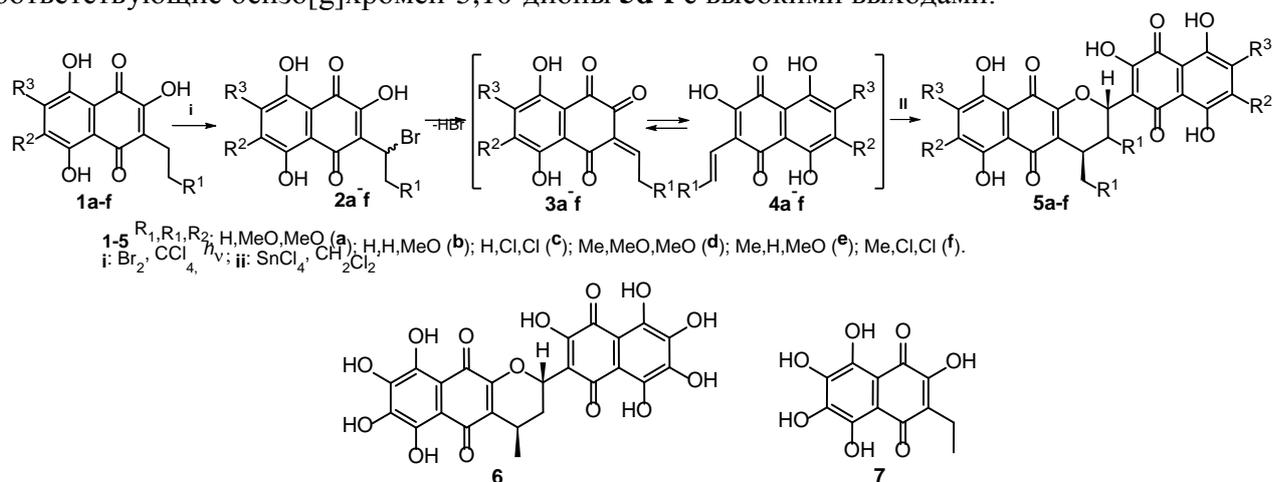
Простой подход к синтезу производных бензо[g]хромендиона. Синтез бихинона нового структурного класса, метаболита морских ежей *Mesocentrotus nudus* и *Strongylocentrotus intermedius*, и родственных соединений

К. Л. Борисова, Г. И. Мельман, Д. Н. Пелагеев, Б. П. Машнев, В. Ф. Ануфриев
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН
Электронная почта: borisovaksenia@mail.ru

Производные нафтазарина (5,8-дигидрокси-1,4-нафтохинона) широко распространены в природе [1] и вызывают интерес как биологически активные соединения. Ранее, при разработке подходов к синтезу пигментов морских ежей, было исследовано фотохимическое бромирование тригидроксиэтилнафтазарина[2]. В продолжение этой работы мы изучили поведение 2-гидрокси-3-алкилнафтазаринов в тех же условиях.

Бромирование гидроксиэтилнафтазаринов **1a-c** неожиданно привело к образованию бензо[g]хромендионов **5a-c**. Вероятно, образование **5a-c** происходит по механизму диеновой конденсации. 1'-Бромэтильные производные **2a-c** теряют HBr, давая еноны **3a-c** (гетеродиены), которые изомеризуются в соответствующие винилхиноны **4a-c** (диенофилы). Соединения **2a-c** очень лабильны и при выделении легко превращаются в соответствующие бензо[g]хромен-5,10-дионы **5a-c**.

В отличие от 1'-бромэтилпроизводных **2a-c**, 1'-бромпропилхиноны **2d-f** при очистке давали только 2-гидрокси-3-пропенильные производные **4d-f**. В то же время в присутствии SnCl₄, 1'-бромпропилхиноны **2d-f** и пропенильные производные **4d-f** легко превращались в соответствующие бензо[g]хромен-5,10-дионы **5d-f** с высокими выходами.



Во время выполнения этого исследования в экстрактах морских ежей *Mesocentrotus nudus* и *Strongylocentrotus intermedius* методом ВЭЖХ-МС был обнаружен ранее неизвестный пигмент [3], время удерживания, УФ- и масс-спектр которого совпали с данными соединения **6**, полученного при гидролизе бензо[g]хромендиона **5a**. Таким образом, выделенный продукт, названный мезоцентрохиноном, является полигидроксилированным нафтохинонилбензо[g]хромендионом, димером эхинохрома (**7**), одного из пигментов морских ежей [1].

Ссылки:

1. Thomson R.H. // 2nd ed. 1971. 3rd ed. 1987. 4th ed. 1997.
2. Melman G.I., Borisova K.L., Pokhilo N.D., Makhankov V.V., Anufriev V.Ph. // Tetrahedron Lett. 2016. V. 57. P. 736-738.
3. Vasileva E.A., Mishchenko N.P., Tran V.T.T., Vo H.M.N., Fedoreyev S.A. // Mar. Drugs. 2021. V. 19. P. 21.

Фукоиданы бурых водорослей семейства Sargassaceae: характеристики структуры и противоопухолевая активность

В. В. Суриц, Р. В. Усольцева, Н. М. Шевченко, С. П. Ермакова
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова,
Дальневосточное отделение РАН
Электронная почта: suritsw@yandex.ru

Фукоиданы – биологически активные полисахариды бурых водорослей, обладающие большим структурным разнообразием: от сульфатированных фуканов до нерегулярных гетерополисахаридов сложного строения. Многочисленные исследования подтверждают широкий спектр их биологической активности, в том числе противоопухолевой [1].

Бурые водоросли семейства Sargassaceae издавна употребляются в пищу и в качестве лекарственных средств. В данном семействе наиболее изученными являются водоросли рода *Sargassum*.

По литературным данным большинство фукоиданов бурых водорослей семейства Sargassaceae представляют собой галактофуканы, однако среди них встречаются как фуканы [2], так и гетерополисахариды, содержащие не только остатки фукозы, но и других моносахаридов. Разное содержание и расположение остатков галактозы вносит существенный вклад в структурное разнообразие исследованных галактофуканов. Остатки галактозы могут находиться в основной цепи и/или ответвлениях. Так, бурая водоросль *Sargassum mcclurei* синтезирует галактофукан с основной цепью из 1,3-связанных остатков α -L-фукозы [3]; *S. crassifolium* продуцирует фукоидан, основная цепь которого построена из чередующихся 1,3- и 1,4-связанных остатков α -L-фукозы [4]. В основную цепь фукоидана из *S. polycystum*, состоящую преимущественно из 1,3-связанных остатков α -L-фукозы, встроены единичные 1,2-связанные остатки α -D-галактозы [5]. Фукоидан из *S. duplicatum* содержит основную цепь из чередующихся 1,4-связанных остатков α -L-фукозы и β -D-галактозы [6], а галактофукан из *S. thunbergii* отличается блочным строением [7].

Было изучено противоопухолевое действие некоторых фукоиданов; показано, что данные полисахариды не являются токсичными, а также в различной степени ингибируют рост колоний опухолевых клеток.

Таким образом, фукоиданы водорослей семейства Sargassaceae отличаются большим структурным разнообразием, а также представляют интерес как соединения, обладающие противоопухолевым действием.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 21-14-00321).

Ссылки:

1. Ponce N., Stortz C. // Front Plant Sci. 2020. V. 11. №. 556312.
2. Silchenko A., Rasin A., Kusaykin M., Kalinovskiy A., Zhang M., Liu C., Malyarenko O., Zueva A., Zvyagintseva T., Ermakova S. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 175. P. 654-660.
3. Thinh P., Menshova R., Ermakova S., Anastuyuk S., Ly B., Zvyagintseva T. // Mar. Drugs. 2013. V. 11. P. 1456-1476.
4. Yuguchi Y., Ly B., Nguyen B., Van T., Thuy T. // Chem. Lett. 2016. V. 45(7). P. 840-842.
5. Bilan M., Grachev A., Shashkov A., Thanh T., Tran V., Ly B., Nifantiev N., Usov A. // Carbohydr. Res. 2013. V. 377. P. 48-57.
6. Usoltseva R., Anastuyuk S., Shevchenko N., Surits V., Silchenko A., Isakov V., Zvyagintseva T., Thinh P., Ermakova S. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 175. P. 547-556.
7. Jin W., Wu W., Tang H., Wei B., Wang H., Sun J., Zhang W., Zhong W. // Mar. Drugs. 2019. V. 17. P. 52-69.

Информация о компании Merck

Life Science подразделение компании Merck объединило в себе продукты и услуги мирового класса, инновационные возможности и исключительный талант компаний Merck Millipore и Sigma-Aldrich, став одним из глобальных лидеров в направлении Life Science. Объединение основано на взаимном дополнении сильных сторон обеих компаний и позволяет нам отвечать Вашим потребностям еще лучше. Теперь в нашем портфеле более 300,000 продуктов. Среди которых оборудование и материалы для клеточного анализа, стерилизующей фильтрации, клеточные линии ECACC и сопутствующие буферы, реагенты, питательные среды и посуда для подготовки и подсчёта клеток, культивирования и детекции, анализа белков, первичные и вторичные антитела, приборы и наборы инструментов для мультиплексного анализа, а также широкий спектр других продуктовых решений в области экспрессии, экстракции и количественного анализа, очистки и концентрирования белков, белкового электрофореза и детекции, а также системы получения сверхчистой воды.

Широкая линейка инновационных продуктов и технологических решений, сбалансированная география и значительные производственные и исследовательские возможности, позволяют превосходить и удовлетворять потребности клиентов, так как все, что мы делаем, начинается с нашей общей цели – решать самые серьезные проблемы в жизни и науке в сотрудничестве с глобальным научным сообществом.

ООО «Мерк»

Сайт: <https://www.sigmaaldrich.com/RU/en>

Тел: 8 800 100-74-25

Email: ruorder@merckgroup.com

Региональный представитель по Сибири и Дальнему Востоку

Грошева Екатерина Викторовна

Тел: +7 (913) 914-94-05

Email: ekaterina.grosheva@merckgroup

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Айриянц К. А.** – 23
 Аминин Д. Л. – 39
 Антоненко А. К. – 27
 Ануфриев В. Ф. – 42, 56
 Артюков А. А. – 32
Бакланов И. Н. – 49
 Балдаев С. Н. – 25
 Барашкова А. С. – 16, 31
 Белик А. А. – 44
 Бердышев Д. В. – 24, 37
 Бизяев С. Н. – 15, 28
 Бикчурина Т. И. – 29
 Бондарь Н. П. – 23
 Борисова К. Л. – 42, 56
 Бородин П. М. – 30
 Бородин Е. А. – 46, 47
 Букатич Е. Ю. – 26
 Буланова Т. А. – 52
 Буракова Е. А. – 15, 28
 Бурняшева А. О. – 22
 Быстрицкая Е. П. – 25
Волконская В. В. – 55
Гилеп А. А. – 10, 32, 33
 Гладких И. Н. – 40
 Гнеденко О. В. – 32, 33
 Голенищев Ф. Н. – 29
 Гольшева Е. А. – 54
 Гончаров Н. В. – 49
 Горпенченко Т. Ю. – 39
 Грабовец И. П. – 32, 33
Давыдова В. Н. – 14
 Деев С. М. – 8
 Держалова А. Ш. – 15
 Дзюба С. А. – 54
 Дормешкин Д. О. – 10
 Дорошков А. В. – 26
 Дышловой С. А. – 41
Ермакова С. П. – 36, 38 43, 44, 57
 Ершов П. В. – 32, 33
Захаренко В. М. – 35
 Звягинцева Т. Н. – 43
 Зубаирова У. С. – 26
Иванов А. С. – 11, 32, 33, 39
 Иванчина Н. В. – 32
 Исаева М. П. – 12, 25
Калина Р. С. – 40
 Калиновский А. И. – 24, 37
 Калужский Л. А. – 18, 32, 33, 39
 Кашеверов И. Е. – 19
 Кветкина А. Н. – 40, 41
 Киселев К. В. – 55
 Кизилова Е. А. – 29
 Кисаретова П. Е. – 23
 Кича А. А. – 32
 Клабенкова К. В. – 15, 28
 Климович А. А. – 34
 Кожушная А. Б. – 37
 Козлова Т. А. – 22
 Козловская Э. П. – 32
 Козловский С. А. – 39
 Кокоулин М. С. – 51
 Колесникова С. А. – 37
 Колосова Н. Г. – 21, 22
 Кусайкин М. И. – 43, 44
Лейченко Е. В. – 40, 41
 Лисачев А. П. – 53
 Лихацкая Г. Н. – 39, 43
 Ляхова Е. Г. – 37
Малиновская Л. П. – 30
 Маляренко О. С. – 41
 Маляренко Т. В. – 35
 Машнев Б. П. – 56
 Мезенцев Ю. В. – 32
 Мельман Г. И. – 56
 Менчинская Е. А. – 39
 Меньшов А. С. – 24
 Мизгина Т. О. – 45, 52
 Мирочник А. Г. – 50
 Молодцева А. С. – 53
 Молчанова В. И. – 45, 52
Огнева З. В. – 55
Павленко А. П. – 41
 Патрушев Д. Э. – 15
 Пеллаев Д. Н. – 42, 56
 Пеунов Д. А. – 22
 Пислягин Е. А. – 39

- Полоник С. Г. – 39
Попкова Д. В. – 34
Попов А. М. – 32
Попов Р. С. – 37
Прокопов Д. Ю. – 53
Ракин А. В. – 25
Расин А. Б. – 43, 44
Решетников В. В. – 23
Рогожин Е. А. – 17, 31
Романенко Л. А. – 51
Романенко С. А. – 53
Рубцов Н. К. – 38
Рудницкая Е. А. – 22
Рябушкина Ю. А. – 23
Сабуцкий Ю. Е. – 39
Свистунова И. В. – 50
Сильченко А. С. – 38, 43
Синцова О. В. – 34, 40
Сморыгина А. С. – 54
Стеценко Д. А. – 15, 28
Стефанова Н. А. – 22
Струшкевич Н. В. – 10, 32, 33
Стышова О. Н. – 32
Суриц В. В. – 36, 57
Сушко Т. А. – 33
Телегина Д. В. – 27
Тимкин П. Д. – 46, 47
Тимофеев Э. А. – 46, 47
Тишакова К. В. – 53
Торгашева А. А. – 30
Торопыгин И. Ю. – 13
Третьякова Г. О. – 50
Трифонов В. А. – 53
Тумилович А. М. – 33
Тюменцев М. А. – 21
Усольцева Р. В. – 36, 57
Фатыхова С. А. – 32
Федоренко Е. В. – 50
Фильштейн А. П. – 51
Флоринская А. В. – 33
Фокина А. А. – 15, 28
Черников О. В. – 45, 51, 52
Чернышева Н. Ю. – 25
Чикаловец И. В. – 45, 51, 52
Чингизова Е. А. – 39
Шабуня П. С. – 32
Шевченко Н. М. – 43, 57
Шеховцева Д. В. – 51
Шкель Т. В. – 32, 33
Шкрабов Р. А. – 36
Юхтанов Д. Х. – 21
Яблоков Е. О. – 18, 32, 33