

**Предварительный сборник  
тезисов школы-конференции**

**Инженерия живых систем —  
достижения и перспективы:**

к 25-летию кафедры биоинженерии  
биологического факультета МГУ

**8–10 ноября 2025, Москва**





Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова  
Биологический факультет

# **ИНЖЕНЕРИЯ ЖИВЫХ СИСТЕМ – ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

**Сборник тезисов докладов школы-конференции  
«Инженерия живых систем – достижения и перспективы»  
к 25-летию кафедры биоинженерии биологического  
факультета МГУ имени М.В.Ломоносова**

**Москва  
2025**

<b>УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ.....</b>	<b>10</b>
Гущин И.Ю. РЕТИНАЛЬ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ.....	10
Долгих Д.А. БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА.....	10
Карпова О.В. ВИРУС ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ – БИОКОНСТРУКТОР ДЛЯ МЕДИЦИНЫ БУДУЩЕГО.....	11
Климов А.А., Финкельштейн А.В. ПАРАДОКСАЛЬНЫЙ "ЭФФЕКТ МПЕМБЫ" В ЧИСТОЙ ВОДЕ ИМЕЕТ ЧИСТО СТОХАСТИЧЕСКОЕ ПРОИСХОЖДЕНИЕ: ЭКСПЕРИМЕНТ И ТЕОРИЯ.....	12
Кузнецов В.В., Носов А.М. ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ В РЕШЕНИИ ГЛОБАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ.....	13
Лаврик О.И. ПОЛИ(АДР-РИБОЗА)-ПОЛИМЕРАЗЫ КЛЕТОЧНОГО ЯДРА В РЕГУЛЯЦИИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ НУКЛЕОСОМ.....	14
Недоспасов С.А. ЦИТОКИНЫ: ОТ ИММУНОБИОЛОГИИ ЧЕРЕЗ ОБРАТНУЮ ГЕНЕТИКУ И БИОИНЖЕНЕРИЮ К ПРОТОТИПАМ ЛЕКАРСТВ.....	15
Попов В.О. СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ: ОТ ПЕРВЫХ СТРУКТУР ДО ЭПОХИ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА.....	16
Сергиев П.В. ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МЫШИНЫХ МОДЕЛЕЙ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ БОЛЕЗНЕЙ.....	16
Соловченко А.Е., Лобакова Е.С. ЭКОБИОИНЖЕНЕРИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ ФОТОТРОФНЫХ ОРГАНИЗМОВ. ВЫЗОВЫ, ПРОГРЕСС И ПЕРСПЕКТИВЫ.....	17
Степанов В.А. ДНК-ДИАГНОСТИКА ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ИНДИВИДА К ОХАРАКТЕРИЗОВАННЫМ ЭТНО-ГЕОГРАФИЧЕСКИМ ГРУППАМ СОЮЗНОГО ГОСУДАРСТВА И ПРИЛЕЖАЩИХ ТЕРРИТОРИЙ.....	18
Шайтан А.К. БИОИНЖЕНЕРИЯ В ЭПОХУ ЦИФРОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ.....	19
Шайтан К.В. ИНЖЕНЕРИЯ ДИНАМИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БИОПОЛИМЕРОВ.....	20
Ямпольский И.В. ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ: ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДО СИНТЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ.....	21
<b>ПОСТЕРНЫЕ ДОКЛАДЫ.....</b>	<b>23</b>
Агибалов К.А. А1. ВЛИЯНИЕ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ НИЗКО- И ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНЫМ СИНТЕЗОМ, НА СЕКРЕЦИЮ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ МОНОЦИТАМИ И МАКРОФАГАМИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO.....	23
Алескерова Л.Э. А2. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ, НАСЕЛЯЮЩИХ ПОДЗЕМНЫЕ	

ХРАНИЛИЩА ГАЗА, И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ГЕОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ПЛАСТЕ.....	25
Алехин В.А.	
Б1. LYSO-RHODOPSIN КОНТРОЛИРУЕМО ПОДКИСЛЯЕТ ЛИЗОСОМЫ: ВОЗМОЖНОСТИ ОПТОГЕНЕТИКИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СОСТОЯНИЯ ЛИЗОСОМ	26
Антонов Д.О.	
Б2. СОЗДАНИЕ НИЗКО-ИММУНОГЕННОЙ ЛИНИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С НОКАУТОМ ГЕНА B2M И ОЦЕНКА ЕЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК.....	27
Ли Сююнь	
РАЗРАБОТКА ГИБРИДНОГО АНТИТЕЛА IGGA-ИЗОТИПА К ИНГИБИТОРУ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ДЛЯ НОВОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ.....	29
Arteaga B.D.	
Б3. PREDICTION OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS THROUGH POINT TRANSFORMER AND SPHERICAL CONVEX HULL GRAPHS.....	31
Багров Д.В.	
А3. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ СЭМ-КЛСМ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ К БИОСОВМЕСТИМЫМ ЭЛЕКТРОФОРМОВАННЫМ МЕМБРАНАМ.....	32
Бикмулина П.Ю.	
А4. ТРЕХМЕРНАЯ БИОПЕЧАТЬ ТКАНЕПОДОБНЫХ СТРУКТУР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК.....	34
Боброва М.М.	
А5. БИОИНЖЕНЕРНЫЙ СКАФФОЛД ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ ОБШИРНЫХ ДЕФЕКТОВ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ.....	36
Бубенчиков М.А.	
Б4. РЕКОНСТРУКЦИЯ ОСЕВОЙ ФИБРИЛЛЫ STX-КОНВЕРТИРУЮЩЕГО БАКТЕРИОФАГА PH124В С ПОМОЩЬЮ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ.....	38
Буркова Е.Е.	
Б5. ДИЗАЙН ГЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЭКСПОНИРОВАНИЕ АНТИГЕНА НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТКИ НА ПРИМЕРЕ S-БЕЛКА SARS-COV-2.....	40
Вахрушева П.А.	
А6. ПРИРОДНЫЕ БИОПОЛИМЕРЫ: ЛИГНИНСОДЕРЖАЩИЕ ГИДРОГЕЛИ В ПРИРОДООХРАННЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ.....	41
Вахрушева Ю.С.	
А7. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ ФАБРИКАЦИЯ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ГИДРОГЕЛЕВЫХ КОНСТРУКТОВ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ.....	43
Герасимов О.А.	
Б6. ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ CRG-ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ ЧИСТОТЫ.....	43
Глебская С.А.	
А8. ДВУХСЛОЙНЫЕ ПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНОГО КОМПЛЕКСА ХИТОЗАНА И ГИАЛУРОНАТА НАТРИЯ С ГЕНТАМИЦИН СУЛЬФАТОМ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ.....	46
Гомбоева Д.А.	



Б7. СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ НОКАУТА И ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА РЕЦЕПТОРА СМЕРТИ DR5.....	47
Гордеева Ю.П.	
А9. РАЗРАБОТКА БИОМАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА МЕДУЗ АЗОВСКОГО МОРЯ.....	48
Грибкова А.К.	
Б8. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ ХРОМАТИНА ЧЕЛОВЕКА, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ГЕНОМА: АНАЛИЗ МЕТОДАМИ БИОИНФОРМАТИКИ.....	50
Деркаев А.А.	
Б9. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАНДИДАТНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ТЕРАПИИ БОТУЛИЗМА.....	51
Дорошенко А.С.	
А10. ВЛИЯНИЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИХ СВОЙСТВ ИССЛЕДУЕМОЙ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ В БУФЕРНОЙ СИСТЕМЕ НА МОДЕЛИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ.....	53
Дубовой С.А.	
Б10. ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННОЙ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ VITIS VINIFERA L. СО СТАБИЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА МВАОЛН.....	55
Егорова И.Е.	
Б11. ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ ДЛЯ МУЛЬТИМОДАЛЬНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК И НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ.....	56
Егорочкин М.Г.	
Б12. КРИО-ЭМ РЕКОНСТРУКЦИЯ КАПСИДА ГИГАНТСКОГО ФАГА РНК601 С РАЗРЕШЕНИЕМ 3,8 Å.....	57
Зайцев П.А.	
А11. IN SITU МЕТАГЕНОМИКА ДЛИННЫХ ЧТЕНИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА СООБЩЕСТВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ БЕЛОГО МОРЯ.....	58
Зубова А.В.	
А12. НА ПУТИ ОТ 2D К 3D – НЕЙРОМОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА.....	60
Иззи А.Р.	
Б13. ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАРКЕРА ПОВРЕЖДЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ.....	61
Ильинский Н.С.	
А13. БИОИНЖЕНЕРИЯ ЛИЗОСОМ КЛЕТКИ: ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВЛИЯНИЯ МЕТФОРМИНА, РАПАМИЦИНА, ТОРИНА НА АКТИВНОСТЬ V-ATPase.....	62
Исакова А.А.	
Б14. ИССЛЕДОВАНИЕ СЕНОЛИТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА DR5-СЕЛЕКТИВНОГО ВАРИАНТА TRAIL В КЛЕТКАХ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ХИМИО-ИНДУЦИРОВАННОЙ СЕНЕСЦЕНТНОСТЬЮ.....	63
Казаков Е.П.	
Б15. АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ В ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА НА ФОНЕ НОКАУТА КОГЕЗИНА.....	64
Казакова К.А.	
А14. РЕГЕНЕРАЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ С	

ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ШЕЛКА.....	65
Калиновский А.П. Б16. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ И САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ВЫЯВИЛИ ОБЩИЙ САЙТ СВЯЗЫВАНИЯ ИНГИБИТОРА И АКТИВАТОРА КАНАЛА TRPV3.....	67
Катичева А.Э. Б17. РАЗНООБРАЗИЕ ВОЗМОЖНЫХ СТРАТЕГИЙ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ СБОРКИ ФРАГМЕНТОВ ДНК ИЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ НА МИКРОЧИПАХ.....	68
Клычкова О.О. Б18. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ЦЕЛЮ ПОВЫШЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ И СЕКРЕЦИИ ИНСУЛИНА.....	69
Коврига Ю.М. Б19. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ NEUROD И ИХ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА.....	71
Коковихина С.А. Б20. РЕГИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА МИКРОГЛИИ ПРИ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА IN VIVO.....	72
Комаров А.А. А15. ПОРИСТЫЕ БИОПОЛИМЕРНЫЕ КАРКАСЫ ИЗ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА ..	72
Косарим Н.А. Б21. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИЗОФОРМ КАНОНИЧЕСКИХ ГИСТОНОВ НА СТАБИЛЬНОСТЬ НУКЛЕОСОМ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ.....	75
Кошкина Д.О. Б22. PARP1 КАК РЕГУЛЯТОР ДОСТУПНОСТИ НУКЛЕОСОМНОЙ ДНК ДЛЯ CRISPR/DCAS-КОМПЛЕКСОВ.....	77
Кристовский Н.В. Б23. АВТОМАТИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРИЗАЦИИ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННО МОДИФИЦИРОВАННЫХ АМИНОКИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГРАФОВОЙ НЕЙРОСЕТИ ESPALOMA CHARGE.....	78
Крюков Ф.А. Б24. ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ СТРЕССА ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ПОДПИТКОЙ АПОПТОЗ-РЕЗИСТЕНТНЫХ КЛЕТОК СНО.....	79
Ксенофонтова А.В. Б25. СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРЕХ ТИПОВ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ДОСТАВКИ НУКЛЕАЗ CAS9 И CAS12A ПО НОКАУТУ МОДЕЛЬНЫХ ЛОКУСОВ, КОДИРУЮЩИХ КОРЕЦЕПТОРЫ ВИЧ.....	81
Кудряшова К.С. Б26. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ В ЯДРАХ DROSOPHILA АРХИТЕКТУРНЫХ БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИХ ДОМЕНЫ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ C2H2-ТИПА.....	83
<b>Куликов В. В</b> <b>БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГИСТОНА H2A.J.....</b>	<b>84</b>
Куковякина Е.В. А16. IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЯ КОМБИНИРОВАННЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ	

БОРТЕЗОМИБА И DR5-СЕЛЕКТИВНОГО TRAIL НА КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	85
Ладнов Э.О.	
Б27. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ АБС ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ.....	86
Лазарева О.А.	
А17. ПЛАЦЕНТА-НА-ЧИПЕ КАК ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ АНАЛИЗА ТРАНСПЛАЦЕНТАРНОГО ПЕРЕНОСА.....	88
Лобанова А.А.	
Б28. НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ И РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ БЕЛКОВ PARP.....	89
Мамедова А.Р.	
Б29. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ВЕРИФИКАЦИЯ ДИНАМИКИ МАРКЕРОВ ПЕРЕХОДА ГРАНУЛЁЗНЫХ КЛЕТОК ЯИЧНИКОВ МЫШЕЙ ВО ВРЕМЕНИ.....	90
Маркина М.П.	
А18. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК НЕК-293Т В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛЬНОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО В-ДЕФЕНЗИНА ЧЕЛОВЕКА 1.....	92
Матюшевская А.О.	
Б30. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЦИТРУЛЛИНИРОВАНИЯ ГИСТОНОВ НА ДИНАМИКУ НУКЛЕОСОМ.....	94
Мерзликин В.А.	
А19. РАЗРАБОТКА БИОСОВМЕСТИМЫХ НАНОВОЛОКОН С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ДЕЙСТВИЕМ.....	95
Миронов П.А.	
Б31. АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ НА ОСНОВЕ ЛИНЕЙНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ЯДА ПАУКА: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МОДЕЛЬНЫМИ ЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ И КЛЕТКАМИ.....	96
Морус Е.В.	
Б32. ИНТЕГРАЦИЯ РВРК-МОДЕЛИ С ВЕБ-ИНТЕРФЕЙСОМ: ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ И ТЕРАПИИ.....	97
Моторин Н.А.	
Б33. ИЗУЧЕНИЕ ЦИТРУЛЛИНИРОВАНИЯ НУКЛЕОСОМНОЙ КОРОВОЙ ЧАСТИЦЫ ФЕРМЕНТОМ RAD4.....	99
Никитеев И.А.	
Б34. ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДИЛТРАНСФЕРАЗЫ С ПОМОЩЬЮ ИТЕРАТИВНОГО МУТАГЕНЕЗА И КОМПЬЮТЕРНОГО ДИЗАЙНА.....	101
Новикова В.С.	
Б35. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ГИСТАТИНА 5 В E. COLI.....	102
Олейников П.Д.	
Б36. ОЦЕНКА АФФИННОСТИ НУКЛЕОСОМ-СВЯЗЫВАЮЩИХ ПЕПТИДОВ МЕТОДОМ ТУШЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ FRET.....	104
Орлов М.Ю.	
А20. АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО АЛЬГИНАТА С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ЭНДОЛИЗИНОМ.....	105
Первушин Н.В.	



Б37. ПОДАВЛЕНИЕ АНТИАПОПТОТИЧЕСКОГО БЕЛКА MCL-1 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ: МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ И СПОСОБЫ ЕЕ ПРЕОДОЛЕНИЯ...	107
Пермякова А.А.	
A21. МОДЕЛИРОВАНИЕ МИННО-ВЗРЫВНОЙ РАНЫ КОЖИ И МЫШЦ У МЫШЕЙ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.....	109
Петрова С.А.	
A22. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОАНГИОГЕННЫХ СВОЙСТВ КОЛЛАГЕНОВЫХ И ЭЛАСТИНОВЫХ БАРЬЕРНЫХ МЕМБРАН В МОДЕЛИ ГЕТЕРОТОПИЧЕСКОЙ ИМПЛАНТАЦИИ КРЫСАМ IN VIVO.....	110
Пивоваров Е.М.	
Б38. ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА С ПОЛИЛИЗИНОВЫМ КЛАСТЕРОМ НА АКТИВНОСТЬ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОГО КАЛИЕВОГО КАНАЛА Kv11.1.....	112
Позднякова Е.Д.	
Б39. РАЗРАБОТКА РЕПОРТЕРНЫХ РНК-КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА СОБЫТИЙ ТРАНСКРИПЦИОННОГО МУТАГЕНЕЗА.....	115
Полянский Д.С.	
A23. ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ AMBR 250 ДЛЯ РАЗРАБОТКИ И МАСШТАБИРОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА..	116
Рощина Е.А.	
Б40. ВКЛЮЧЕНИЕ ВАРИАНТНОГО ГИСТОНА H3.3 В СОСТАВ НУКЛЕОСОМ УСИЛИВАЕТ ИХ СВЯЗЫВАНИЕ С dCas9.....	119
Рубальская К.С.	
A24. ТРАНСДЕРМАЛЬНАЯ ДОСТАВКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА.....	120
Рыкова А.Ю.	
A25. ЛИНИЯ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ CD44-GFP, ДЛЯ МОНИТОРИНГА ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ.....	121
Рябова Е.И.	
A26. ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ТРАНСФЕКЦИИ И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК НЕК293 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА.....	122
Рябова Н.А.	
Б41. ИССЛЕДОВАНИЕ АМИЛОИДНОЙ АГРЕГАЦИИ БЕЛКА hSAA, СВЯЗАННОГО С РАЗВИТИЕМ ВТОРИЧНОГО АМИЛОИДОЗА.....	124
Савочкин А.В.	
Б42. ИНТЕГРАТИВНЫЙ АНАЛИЗ СЕТЕЙ КОЭКСПРЕССИИ MRNA–MIRNA–LNCRNA ПО ДАННЫМ RNA-SEQ.....	125
Саин А.Ю.	
A27. МЯГКИЙ МУЛЬТИМОДАЛЬНЫЙ ИМПЛАНТ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА.....	127
Саулина А.А.	
Б43. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО WGR-ДОМЕНА PARP2 ЧЕЛОВЕКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ВЛИЯНИЯ НА СТРУКТУРУ НУКЛЕОСОМ.....	129
Селиванова Е.А.	
A28. МАЛ ДА УДАЛ: НАНОГАЛОАРХЕЯ КАК ВАЖНЫЙ КОМПОНЕНТ ЭКСТРЕМАЛЬНО ГАЛОФИЛЬНОЙ АССОЦИАЦИИ ПОЛИСАХАРИДОЛИТИКОВ.....	130

Семено М.А. Б44. АНАЛИЗ СТЕХИОМЕТРИИ C-RING АТФ-СИНТАЗ ТЕРМОФИЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ.....	132
Сергеевцева М.Б. Б45. СОЗДАНИЕ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАЗЫ SARS-COV-2 3CLPRO IN VITRO.....	133
Середа А.А. А29. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОЛЛАГЕНА МЕДУЗ АЗОВСКОГО МОРЯ.....	134
Сидорова А.Е. А30. СМАЧИВАЕМОСТЬ ЭЛЕКТРОФОРМОВАННЫХ МЕМБРАН ИЗ СМЕСЕЙ ПОЛИЭФИРОВ С АЛЬБУМИНОМ.....	136
Сильченко Д.А. Б46. ВЫБОР СИСТЕМЫ СБОРКИ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ С НУКЛЕАЗАМИ CAS9 И CAS12A ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ, РЕЛЕВАНТНЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ CAR-T-КЛЕТОК.....	137
Сингх-Пальчевская Л. Б47. КЛАСТЕРНЫЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГИСТОНОВ H2B.S.....	139
Ситдикова К.К. Б48. НОВЫЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА СОСТОЯНИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ИСКУССТВЕННОЙ НЕЙРОННОЙ СЕТИ 140	
Смольянинова Л.В. Б49. ГОРМОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ У КАСПАЗА-2 НОКАУТНЫХ МЫШЕЙ СВЯЗАННЫЕ С ИНФЕРТИЛЬНОСТЬЮ.....	142
Спиридонова А.Л. А31. ТЕХНОЛОГИЯ 3D-ПЕЧАТИ МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПОВ ДЛЯ ГЕНЕРАЦИИ ГИДРОГЕЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ С ИММОБИЛИЗИРОВАННЫМИ МИКРОВОДОРОСЛЯМИ.....	144
Степанова Е.Ю. Б50. МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ИОН-БЕЛКОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В КАЛИЙ-ХЛОРИДНОМ КОТРАНСПОРТЕРЕ KCC2.....	146
Стренина Д.О. Б51. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ IRES РИНОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА И ВИРУСА ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА ДЛЯ КОЭКСПРЕССИИ СУБЪЕДИНИЦ ГЛИКОПРОТЕИНОВЫХ ГОРМОНОВ.....	148
Сыроватская Я.В. Б52. БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНА S100B В ВЕКТОР pComb3XSS ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА.....	149
Тарасов К.А. А32. МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ИЗ ГЛУБОКОГО ПОДЗЕМНОГО ИСТОЧНИКА БАКСАНСКОЙ НЕЙТРИННОЙ ОБСЕРВАТОРИИ....	151
Узденов А.А. Б53. ИНТЕГРАТИВНЫЙ ОТБОР ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫХ МИШЕНЕЙ CRISPR/CAS9 ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ.....	152
Федулова А.С. Б54. МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДНК-ГИСТОНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ	153

Фескин П.Г.	
Б55. РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ДНК-ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ.....	154
Хоссаин М.А.	
Б56. МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА С КОМПОЗИТНЫМИ НАНОМАТЕРИАЛАМИ.....	156
Царькова О.А.	
Б57. ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА ГИБРИДНОГО БЕЛКА НА ОСНОВЕ TRAIL С МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩЕЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ.....	158
Чумаков М.И.	
Б58. ОТ ЛИНИЙ-ГАПЛОИНДУКТОРОВ К ГЕНАМ И БЕЛКАМ ГИНОГЕНЕЗА КУКУРУЗЫ.....	159
Шматин И.И.	
Б59. СВОЙСТВА ГЕТЕРОКАНАЛОВ Kv(1.1-1.2)2 С ПАТОГЕННОЙ МУТАЦИЕЙ T226R В СУБЪЕДИНИЦЕ Kv1.1.....	160
Юань Ц.	
Б60. УСИЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГИБРИДНОГО БЕЛКА НА ОСНОВЕ ЦИТОКИНА TRAIL ЗА СЧЕТ СПЕЦИФИЧНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С РЕЦЕПТОРАМИ DR5, VEGFR2 и FGFR1.....	161



# УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

## РЕТИНАЛЬ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ

Гущин И.Ю.

*Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)*

Семиспиральные ретиналь-связывающие белки занимают особое место среди множества природных фоторецепторных систем. Опсины животных – млекопитающих, насекомых, моллюсков и других – лежат в основе зрительных органов. Микробные родопсины обеспечивают поддержание ионного баланса, генерацию АТФ и реагирование на освещение у бактерий, архей, водорослей и грибов. Благодаря своей распространенности и доступности для исследований, родопсины служат модельными системами для множества биофизических методов, и в последнее время также нашли широкое применение в качестве оптогенетических инструментов. Хотя основные аспекты функционирования микробных родопсинов известны уже давно, до сих пор остается ряд нерешенных вопросов. В докладе будет представлена эволюция представлений о функционировании микробных родопсинов на атомарном уровне, последние результаты рентгеноструктурных, функциональных и оптогенетических экспериментов, а также данные об инженерии растворимых аналогов мембранных родопсинов – нового многообещающего класса светочувствительных белков для клеточной биологии.

## БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА

Долгих Д.А.

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук*

В докладе рассматривается развитие биоинженерии рекомбинантных белков - от первых работ по получению мутантных вариантов природных белков с улучшенными свойствами и созданию искусственных белков с заданной пространственной структурой и биологической активностью до современных работ в этой области, в которых широко используются методы машинного обучения и искусственного интеллекта. Применение этих методов привело к огромному прогрессу в данной области и открыло новые перспективы широкого использования белковой инженерии для нужд человека.

## ВИРУС ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ – БИОКОНСТРУКТОР ДЛЯ МЕДИЦИНЫ БУДУЩЕГО

Карпова О.В.

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова*

*karpovaov@ty.msu.ru*

**Ключевые слова:** вирусы растений, ВТМ, биоконструктор, вакцины, медицинские биотехнологии

Открытый Д.И. Ивановским в 1892 году, вирус табачной мозаики (ВТМ) навсегда вошел в историю как первый обнаруженный вирус, положивший начало новой науке – вирусологии. ВТМ оказался удивительно удобной экспериментальной моделью. С помощью ВТМ впервые была изучена самосборка вирусных частиц, был открыт активный транспорт вирусов растений из клетки в клетку. Невероятная стабильность ВТМ позволила ученым впервые кристаллизовать вирусный препарат.

До начала 21 века изучение вирусов растений имело в основном фундаментальное значение, но затем ситуация кардинально изменилась: безопасный для млекопитающих и обладающий всеми уникальными свойствами вирусных частиц ВТМ трансформировался в уникальную платформу для биотехнологических и биомедицинских приложений с большим потенциалом. Физико-химические свойства ВТМ – высокая стабильность, строгая геометрия, способность к самосборке –, а также детально изученный химический состав поверхности вириона позволили использовать его в качестве биоконструктора для создания новых биоматериалов в медицине и вакцинологии.

На биологическом факультете МГУ разработана уникальная технология получения структурно модифицированных сферических частиц (СЧ) из ВТМ, которые одновременно играют роль платформы с высокими адсорбционными свойствами для презентации функционально активных веществ и эффективного адъюванта. Адсорбируя на поверхности СЧ ВТМ антигены патогенов человека любого состава и размера, можно конструировать вакцинные препараты против широкого спектра инфекций, в том числе поливалентные. СЧ ВТМ, декорированные рекомбинантными антигенами, имитирует безопасную вирусную частицу, способную заменить аттенуированные вирионы возбудителя, которые сейчас используются в препаратах большинства вакцин. Разработаны и созданы вакцинные кандидаты против ряда инфекционных заболеваний человека и животных, которые находятся на разных этапах испытаний<sup>1</sup>. Кроме того, СЧ ВТМ могут выполнять роль платформы для доставки противоопухолевых препаратов в клетки (клетки саркомы Юинга)<sup>2</sup>.

Разработка новых методов доставки является важной и актуальной задачей при применении мРНК-технологий. В ряде работ было продемонстрировано, что частицы ВТМ могут эффективно проникать в клетки млекопитающих. Неожиданным решением может стать доставка функциональных мРНК в клетки человека с использованием способности ВТМ собираться в частицы из целевой РНК и белка оболочки ВТМ. При добавлении сигнала сборки (origin of assembly) к целевым мРНК, они будут одеваться в белок оболочки ВТМ, будут защищены от воздействия внешней среды (РНКазы), а в клетке при котрансляционном раздевании частиц, характерном для ВТМ целевая мРНК будет транслироваться, образуя антиген патогена.

### Список литературы

1. Kovalenko., et al., Vaccine Candidate Against COVID-19 Based on Structurally Modified PlantVirus as an Adjuvant// Front Microbiol 2022. Vol. 13, Article 845316.

## ПАРАДОКСАЛЬНЫЙ "ЭФФЕКТ МПЕМБЫ" В ЧИСТОЙ ВОДЕ ИМЕЕТ ЧИСТО СТОХАСТИЧЕСКОЕ ПРОИСХОЖДЕНИЕ: ЭКСПЕРИМЕНТ И ТЕОРИЯ

Климов А.А., Финкельштейн А.В.

*Институт белка РАН*

*afinkel@vega.protres.ru*

«Эффект Мпембы» – название утверждения, что горячая вода замерзает быстрее холодной<sup>1</sup>, или, в современной и более общей форме, что система, изначально более далекая от своего равновесного состояния, приходит к этому состоянию раньше<sup>2</sup>. Это контринтуитивное утверждение, по видимости, нарушает фундаментальные физические законы; но многочисленные эксперименты с классическими и квантовыми системами<sup>3-5</sup> продемонстрировали этот парадоксальный эффект, что привело к его обширному обсуждению в ведущих научных журналах<sup>2,5,6</sup>. Однако фундаментальные физические механизмы, лежащие в основе этого эффекта, всё ещё остаются неуловимыми<sup>6</sup>. В этой работе мы показываем, что эффект Мпембы в воде возникает из-за стохастической природы зародышеобразования льда. Мы повторили эксперименты по замораживанию воды в тщательно контролируемых условиях и обнаружили, что эффект Мпембы возникал только тогда, когда температура морозильника была близка к температуре нуклеации льда. В этом случае диапазон времени замерзания как горячей, так и холодной воды настолько велик, что он превышает задержку, связанную с более медленным охлаждением изначально более горячей жидкости, которая иногда замерзает раньше изначально холодной. Наш теоретический анализ показывает, что «случайность» касающегося замерзания воды парадокса Мпембы коренится в стохастической природе нуклеации льда, типичной для фазовых переходов первого рода, хотя в ряде других систем эффект Мпембы происходит совершенно закономерно<sup>7</sup>. Мы ожидаем, что наш анализ станет отправной точкой для пересмотра известного парадокса Мпембы в воде и других системах, претерпевающих подобные фазовые переходы.

Мы благодарны Б.С. Мельнику за помощь в экспериментальной и теоретической работе, В.В. Филимонову и С.А. Гарбузинскому за дискуссии, и РФФИ (грант № 25-14-00260) за поддержку.

### Список литературы

1. E.B. Mpemba, D.G. Osborne (1969) Cool? Phys. Educ. 4:172–175.
2. L.K. Joshi et al. (2024) Observing the quantum Mpemba effect in quantum simulations. Phys. Rev. Lett. 133:010402.
3. D. Auerbach. Supercooling and the Mpemba effect: when hot water freezes quicker than cold. (1995) Am. J. Phys. 63:882–885.
4. A. Kumar, J. Bechhoefer (2020) Exponentially faster cooling in a colloidal system. Nature 584:64–68.
5. J. Zhang et al. (2025) Observation of quantum strong Mpemba effect. Nature Communications 6:301.
6. A. Santos (2024) Mpemba meets Newton: Exploring the Mpemba and Kovacs effects in the time-delayed cooling law. Phys. Rev. E 109:044149.
7. A.V. Finkelstein (2025) Analogue of the Mpemba effect in classical mechanics. arXiv:2503.22387.



## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ В РЕШЕНИИ ГЛОБАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ

Кузнецов В.В.<sup>1,2\*</sup>, Носов А.М.<sup>2,1</sup>

1. *Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.*

2. *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, Москва, Россия*

*\*vlkuzn@mail.ru*

**Ключевые слова:** борьба с голодом, клеточные биотехнологии, сохранение биоразнообразия, поиск альтернативных источников энергии

Физиология растений изучает закономерности, механизмы и регуляцию сложных физиологических процессов и занимает промежуточное положение между общей биологией и физико-химической биологией. Физиология растений как наука фундаментальная вовлекается в решение многих глобальных проблем, таких как борьба с голодом и с болезнями, сохранение биоразнообразия редких и исчезающих видов растений, предотвращение последствий неблагоприятных глобальных изменений климата и катастрофического техногенного загрязнения окружающей среды, поиск альтернативных источников энергии, экономное расходование пресной воды и др. Все эти проблемы в той или иной мере связаны с ростом населения, истощением природных ресурсов и загрязнением среды обитания.

Физиология растений вместе с рядом смежных наук является теоретической основой интенсивного земледелия и фундаментальной базой трех зеленых революций, каждая из которых приводила к удвоению урожая. Негативные глобальные изменения климата требуют создания стресс-толерантных растений методами классической генной инженерии или геномного редактирования, что невозможно без знания физиологических и молекулярных механизмов устойчивости растений к повреждающим абиотическим факторам.

Для борьбы с болезнями растения выступают в качестве источника десятков и сотен тысяч ценных биологически активных соединений. Их получение из дикорастущих видов растений приводит к истощению и полному исчезновению сырьевой базы. Данная проблема решается путем разработки биотехнологий получения изолированных клеток и органов растений – суперпродуцентов важнейших лекарственных соединений. Применение этих технологий позволяет сохранять редкие и исчезающие виды.

Для сохранения биоразнообразия генофондов физиология растений создает также уникальные коллекции, включая криоколлекции, хранения изолированных клеток, тканей и органов растений, а также микроводорослей и цианобактерий.

Важной экологической проблемой является способность фитоценозов адаптироваться к быстрым, с эволюционной точки зрения, почти мгновенным изменениям условий обитания. Другой глобальной проблемой является сокращение эмиссии парниковых газов и увеличение стоков CO<sub>2</sub>, что частично может быть решено за счет активного лесовосстановления и создания высокопродуктивных лесных плантаций.

Энергетическая проблема является важнейшей среди других глобальных вызовов. Одним из наиболее перспективных видов топлива будущего является водород. Неисчерпаемым возобновляемым источником водорода является вода. Для получения водорода как альтернативного источника энергии проводятся фундаментальные исследования и разработки систем искусственного или полу-искусственного фотосинтеза.

В докладе обосновывается идея, согласно которой физиология растений занимает важное место в решении стоящих перед человечеством глобальных проблем.

## ПОЛИ(ADP-РИБОЗА)-ПОЛИМЕРАЗЫ КЛЕТОЧНОГО ЯДРА В РЕГУЛЯЦИИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ НУКЛЕОСОМ

Лаврик О. И.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

*lavrik@lbio.ru*

**Ключевые слова:** поли(ADP-рибозил)ирование, модификация гистонов, структура нуклеосом, репарация ДНК

Поли(ADP-рибозил)ирование (PAR-илирование), катализируемое ферментами семейства PARP, в первую очередь ядерными PARP1 и PARP2, – один из ключевых механизмов клеточного ответа на генотоксический стресс. PARP1/2 активируются на повреждениях ДНК и катализируют синтез отрицательно заряженного полимера поли(ADP-рибозы) (PAR), используя в качестве субстрата никотинамидадениндинуклеотид (NAD<sup>+</sup>). PAR присоединяется ковалентно к PARP1/2, а также к другим белкам-мишеням, в том числе к гистонам, что приводит к ремоделированию хроматина и доступности повреждений ДНК для их эффективной репарации. Сравнительно недавно был открыт белковый фактор PAR-илирования гистонов HPF1. HPF1 образует единый активный центр с PARP1/2 и инициирует модификацию гистонов по остаткам серина [1, 2]. Наши исследования выявили взаимосвязь между наличием и локализацией однонуклеотидной брешы ДНК в нуклеосоме (NCP) и активностью PARP1/2 в процессе аутомодификации и модификации гистонов [3-5]. Используя сочетание биохимических и физико-химических методов, мы показали, что архитектура NCP влияет на эффективность и характер ADP-рибозилирования гистонов и на связывание ферментов PARP с поврежденной ДНК в составе нуклеосомы в большей степени для PARP2, чем для PARP1. PARP1 и PARP2 проявляют различную чувствительность к структурным особенностям NCP, что дополнительно указывает на их специфическую роль в ответе на повреждения ДНК и в ремоделировании хроматина. Оказалось, что PARP1 и PARP2 работают в хроматине по-разному. PARP1 в основном осуществляет аутомодификацию, то есть PAR-илирует сам себя, более эффективно, чем модифицирует гистоны. PARP2 модифицирует гистоны эффективнее и точнее, и именно он создает более прицельный сигнал о повреждении, PAR-илируя гистоны, находящиеся преимущественно в непосредственной близости к разрыву ДНК [5]. Благодаря этому, PAR-илирование гистонов позволяет «открыть» для репарации участок ДНК, имеющий повреждение и тем самым обеспечить доступ к повреждению ферментов репарации. PAR-илирование, катализируемое PARP2 в присутствии HPF1, приводит к более эффективному синтезу ДНК, катализируемому ДНК-полимеразой  $\beta$  в короткозаплаточном пути репарации оснований (BER) на NCP. Кроме того, PAR-илирование, зависимое от HPF1, положительно регулирует длиннозаплаточный путь BER [6]. Результаты показали зависимость степени и характера ADP-рибозилирования от наличия специфичных для BER повреждений ДНК в различных суперспиральных участках ДНК или в линкерных областях за пределами NCP. В целом, исследования HPF1-зависимости активности PARP1 и PARP2, а также структурной динамики NCP, позволяют предположить, что характер и локализация повреждения ДНК, а также индуцируемая повреждением

модификация гистонов имеют решающее значение для специфической роли PARP1 или PARP2 в ответе на генотоксический стресс.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 25-74-30006).

#### Список литературы

1. Gibbs-Seymour I. et al. HPF1/C4orf27 Is a PARP-1-Interacting Protein that Regulates PARP-1 ADP-Ribosylation Activity // Mol Cell. 2016. Vol. 62, № 3. P. 432–442.
2. Кургина Т.А., Лаврик О.И. Поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 и 2: классические функции и взаимодействие с HPF1 – новым фактором поли(ADP-рибозил)ирования гистонов // Молекуляр. биология. 2023. Т. 57, № 2. С. 254-268.
3. Kurgina T. et al. Dual function of HPF1 in the modulation of PARP1 and PARP2 activities // Commun Biol. 2021. Vol. 4, № 1. P. 1259.
4. Kurgina T. et al. The HPF1-dependent histone PARylation catalyzed by PARP2 is specifically stimulated by an incised AP site-containing BER DNA intermediate // DNA Repair. 2022. Vol. 120. P. 103423.
5. Kurgina T. et al. Deciphering the dark side of histone ADP-ribosylation: what structural features of damaged nucleosome regulate the activities of PARP1 and PARP2 // Nucleic Acids Res. 2025. V. 53, № 17. P. gkaf864.
6. Kutuzov M. et al. HPF1 Regulates Pol  $\beta$  Efficiency in Nucleosomes via the Modulation of Total Poly(ADP-Ribose) Synthesis // Int J Mol Sci. 2025. V. 26, № 5. P. 1794.

### **ЦИТОКИНЫ: ОТ ИММУНОБИОЛОГИИ ЧЕРЕЗ ОБРАТНУЮ ГЕНЕТИКУ И БИОИНЖЕНЕРИЮ К ПРОТОТИПАМ ЛЕКАРСТВ**

Недоспасов С.А.

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Научно-технологический Университет "Сириус"*  
*sergei.nedospasov@gmail.com*

Цитокины представляют собой молекулярные медиаторы коммуникаций между клетками, причем они вовлечены практически во все аспекты развития организма, а не только его иммунной системы. Обратная генетика позволяет создавать организмы с дефицитом или модификацией функций выбранного гена, что позволило установить физиологические функции продуктов тысяч генов. Иммунология – та биологическая наука, развитие которой за последние десятилетия в значительной степени зависело именно от успехов технологий обратной генетики. Несмотря на то, что у человека и животных присутствует примерно сотня генов цитокинов (многие из которых передают сходные внутриклеточные сигналы в клетках-мишенях, что определяются сходством в структуре их рецепторов) для большинства цитокинов найдены уникальные, невырожденные функции. Одновременно были обнаружены патогенные свойства цитокинов при различных модельных заболеваниях, что позволило определить потенциальные терапевтические мишени. На основании этой информации могли быть найдены или сконструированы прототипы лекарств: как малые молекулы, так и терапевтические антитела. В лекции на конкретных примерах из области изучения функций цитокинов будет показано, как новые знания в совокупности с технологиями инженерии антител приводят к новым терапевтическим стратегиям и инновационным лекарствам

## СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ: ОТ ПЕРВЫХ СТРУКТУР ДО ЭПОХИ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА

Попов В.О.

*Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»  
РАН*

*v.popov@fbras.ru*

В ретроспективном плане будет рассмотрено изменение методологии структурно-биологических исследований в последние десятилетия. Будут приведены примеры из собственной практики рентгеноструктурных и криоЭМ исследований биомакромолекул и их комплексов.

### ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МЫШИНЫХ МОДЕЛЕЙ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ БОЛЕЗНЕЙ

Сергиев П.В.<sup>1,2\*</sup>, Аверина О.А.<sup>1</sup>, Пермьяков О.А.<sup>1</sup>, Гусева Е.А.<sup>1,2</sup>, Болихова А.К.<sup>1,2</sup>, Приймак А.В.<sup>1</sup>, К.Н. Айсин<sup>1</sup>, М.А. Хохлова<sup>1</sup>, Григорьева О.О.<sup>1</sup>, Манских В.Н.<sup>1</sup>, А.М. Мазур<sup>3</sup>, Прохорчук Е.Б.<sup>3</sup>, Тюльпаков А.Н.<sup>4</sup>, А.В. Марченко<sup>6</sup>, Донцова О.А.<sup>1,2,5</sup>

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

*2. Центр молекулярной и клеточной биологии Сколковского института науки и технологий, Сколково, Россия*

*3. ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

*4. Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия*

*5. Институт биоорганической химии имени акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

*6. Фонд перспективных исследований, г. Москва, Россия*

*\*petya@genebee.msu.ru*

**Ключевые слова:** редактирование генома, генетические технологии, мышинные модели, персонализированная медицина, редкие заболевания, онкогенез.

Цель работы – создание и характеристика персонализированных мышинных моделей, воспроизводящих как специфические генетические варианты пациентов с редкими заболеваниями, так и направленные онкогенные мутации, для установления причинно-следственных связей в патогенезе и разработки терапевтических стратегий.

Основная идея заключается в применении технологий редактирования генома для точного воспроизведения в геноме мыши патогенных мутаций человека, что позволяет моделировать заболевания *in vivo*. Для онкологических исследований особую важность представляет развитие опухоли в иммунокомпетентном животном, следующее за возникновением заданных соматических мутаций.

Путь решения включал два направления. В первом случае идентифицированные у пациентов мутации в генах FLAD1 и SLC5A6 вносились в геном мышей с помощью системы CRISPR/Cas9. Во втором – для моделирования онкогенеза была создана система направленного редактирования соматических клеток печени мышей *in vivo*, использующая комбинацию CRISPR/Cas9 для инактивации опухолевых супрессоров и транспозонных векторов для эктопической экспрессии онкогенов.

Результаты. На моделях редких заболеваний (FLAD1, SLC5A6) были установлены причинно-следственные связи и выявлены неочевидные особенности патологий. В онкологических моделях различные сочетания активации онкогенов и инактивации

онкосупрессоров приводили к возникновению опухолей с разной скоростью, клинической картиной и патоморфологией.

Обсуждение. Полученные данные подтверждают, что создание персонализированных мышиных моделей является мощным инструментом для расшифровки молекулярных механизмов широкого спектра заболеваний. Разработанная платформа для направленного онкогенеза позволяет создавать опухоли с предопределенным набором мутаций, что критически важно для доклинических испытаний таргетных препаратов и поиска неоантигенов для иммунотерапии.

Работа поддержана грантами Минобрнауки № 075-15-2021-1062, № 075-15-2024-539, Фонда перспективных исследований (договор № 6/321/2024-2025ав) и Программой развития МГУ (Научные школы МГУ, №24-Ш04-13).

## **ЭКОБИОИНЖЕНЕРИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ ФОТОТРОФНЫХ ОРГАНИЗМОВ. ВЫЗОВЫ, ПРОГРЕСС И ПЕРСПЕКТИВЫ**

Соловченко А.Е., Лобакова Е.С.

*МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет*

Использование биотехнологий, основанных на культивировании оксигенных фототрофов (микроводорослей), способно дать ответы на важнейшие вызовы нашей цивилизации, включая необходимость обеспечения энергетической и продовольственной безопасности, а также сохранения качества окружающей среды. Создание современных фотобиотехнологий, ориентированных на достижение целей Национального проекта РФ «Биоэкономика», требует использования передовых биоинженерных подходов. Один из актуальных трендов – пополнение методологического арсенала биоинженерии методами, основанными на манипулировании целыми организмами, симбиотическими системами, включающих оксигенные фототрофные микроорганизмы и природными сообществами, в том числе для конструирования модельных сообществ и ассоциаций, различных по сложности и функциональному профилю. В последние десятилетия наблюдается взрывной рост интереса исследователей и практиков к данной проблематике и расширению направлений исследований в экологической биоинженерии.

На кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова ведутся исследования и разработки по многим направлениям экологической биоинженерии и фотобиотехнологии. К динамично развивающимся направлениям относится биоразведка (bioscouting) – исследование биоразнообразия оксигенных фототрофных микроорганизмов в природных экосистемах, включая симбиотические сожительства и ассоциации, а также антропогенно нарушенные биотопы, для получения штаммов и сообществ, важных для фундаментальных исследований и перспективных с точки зрения биотехнологий и биоинженерии. Дополнительный импульс этому направлению придали исследования по проектам «Ноев ковчег» («Национальный банк-депозитарий живых систем») и «1000 арктических геномов».

Большое внимание уделяется разработке методам параметрического управления культивированием фототрофных организмов для максимального полного раскрытия их биотехнологического потенциала. В рамках этих проектов были получены патентованные отечественные штаммы микроводорослей и разработаны способы их культивирования для производства натурального мощнейшего биоантиоксиданта астаксантина и других ценных натуральных пигментов, а также незаменимых жирных кислот. Выделены и охарактеризованы уникальные штаммы для поглощения техногенных выбросов углекислоты из симбиоза и биоудаления фосфатов и нитратов из

сточных вод. Разработаны подходы для использования культур микроводорослей, иммобилизованных на биосовместимых и биodeградируемых полимерных носителях, для валоризации сточных вод с попутной их очисткой.

Активно развиваются методы автоматизации культивирования с использованием неинвазивного мониторинга, основанного на спектральных измерениях и алгоритмах машинного обучения. Полученные результаты могут быть положены в основу решений для культивирования микроводорослей в замкнутых системах жизнеобеспечения (пилотируемых космических миссий, планетарных и орбитальных и станций, подводных судов). К перспективным направлениям, поддержанным системой Научно-образовательных школ МГУ, также относятся поиск путей применения секвенирования третьего поколения (TGS) для метагеномных исследований микробиомов и конструирования инженерных сообществ с заданными функциональными возможностями.

В докладе дается краткий очерк ключевых достижений коллектива кафедры в области экологической биоинженерии и фотобиотехнологий для валоризации отходов и бросовых ресурсов, технических решений для энергоэффективных культивационных систем, обеспечивающих стабильное и рентабельное получение возобновляемого сырья и биопродуктов из фототрофных микроорганизмов в открытых и закрытых системах, освещаются приоритетные направления дальнейших исследований.

## **ДНК-ДИАГНОСТИКА ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ИНДИВИДА К ОХАРАКТЕРИЗОВАННЫМ ЭТНО-ГЕОГРАФИЧЕСКИМ ГРУППАМ СОЮЗНОГО ГОСУДАРСТВА И ПРИЛЕЖАЩИХ ТЕРРИТОРИЙ**

Степанов В.А.<sup>1</sup>, Харьков В.Н.<sup>1</sup>, Скалин М.Д.<sup>2</sup>, Колесников Н.А.<sup>1</sup>, Вагайцева К.В.<sup>1</sup>, Белопольская О.Б.<sup>2</sup>, Боринская С.А.<sup>2</sup>, Янковский Н.К.<sup>2,3\*</sup>

*1. Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН*

*2. Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН*

*3. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова*

*\*yankovsky@vigg.ru*

**Ключевые слова:** ДНК-идентификация, криминалистика, генетические технологии

Набор реагентов «СтепОр» создан в рамках внедрения результатов программы «ДНК-идентификация» и включает панель маркеров, наиболее полно исследованных в выборках народов, проживающих на территории Союзного государства России и Беларуси. На основе этих маркеров Томским национальным исследовательским медицинским центром (ТНИМЦ) создана уникальная база данных Y-STR гаплотипов, отражающая генетическое разнообразие мужчин из 84 исследованных в ходе внедрения этно-региональных групп, что составляет 56% от общего числа основных этно-региональных групп России (150 групп). ДНК-диагностика принадлежности индивида к одной из охарактеризованных этно-географических групп населения Союзного государства и прилежащих территорий позволяет с высокой точностью определять территориальное происхождение мужчины по Y-STR профилю его ДНК, полученному с помощью набора «СтепОр» из биообразца с места расследуемого события. Мультиплексная ПЦР-амплификация набором «СтепОр» в одной пробирке с 37 STR маркерами Y-хромосомы индивида позволяет на отечественном оборудовании за сутки получить и проанализировать уникальный набор фрагментов ДНК (гаплотип индивида). Гаплотип указывает (ДНК-диагностирует) принадлежность индивида к одной или немногим родственным этно-географическим группам, из которой

происходит данный мужчина. Набор «СтепОр» производится в ООО «ГОРДИЗ» и доступен для потребителей <https://gordiz.ru/products/dna-hid/cordis-stepor/>.

Установление этно-географической принадлежности гаплотипа из проверяемого биоследа является решением диагностической задачи расследования, сокращающим число анализируемых по ДНК групп индивидов и стоимости расследования до 84 раз. Это не исключает необходимости решения конечной задачи расследования – идентификационной задачи – то есть идентификации индивида, которая решалась и решается сейчас только с применением базы данных ФБДГИ и набора реагентов КОДИС. Однако отсутствие в ФБДГИ идентифицирующей информации по биоследу данного индивида не мешает немедленному решению диагностической задачи и выходу на следующий день в том же образце ДНК на достаточно узкую единичную этно-территориальную группу, на которой организационно и экономически доступно проанализировать достаточное количество индивидов группы по набору КОДИС. Не менее важный эффект дополнения расследования диагностическим подходом это даже не сам экономический эффект, а то, что расследование может быть продлено немедленно, что особенно важно, если преступление тяжкое, чтобы расследование не отложилось на неопределенное количество лет, ожидая, пока преступник не свершит повторное преступление и тогда найдется в ФБДГИ.

## БИОИНЖЕНЕРИЯ В ЭПОХУ ЦИФРОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Шайтан А.К.<sup>1,2</sup>

*1. кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия*

*2. Исследовательский центр в сфере искусственного интеллекта, Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия*

*\* [shaytan\\_ak@mail.bio.msu.ru](mailto:shaytan_ak@mail.bio.msu.ru)*

**Ключевые слова:** биоинженерия; инженерная биология; цифровые технологии; искусственный интеллект; компьютерное моделирование

Современная биоинженерия выходит на новый этап развития благодаря активному применению цифровых и инженерных принципов и технологий. В то же время цифровые принципы дискретного кодирования информации в молекулах ДНК/РНК лежат в основе функционирования и эволюции живых систем, а биоинспирированные принципы обработки информации активно используются в технологиях искусственного интеллекта. Накопление больших биологических данных и их обработка нейросетевыми алгоритмами привели к революции в решении ряда задач молекулярной и структурной биологии (например, алгоритм AlphaFold), а также имеют значительный потенциал для совершенствования задач молекулярного дизайна. Серьезный прогресс также намечается в использовании подходов машинного обучения для описания взаимодействий между биологическими молекулами и молекулярными системами, в том числе «нечетких» взаимодействий, включающих неупорядоченных фрагменты биомолекул. В то же время одним из главных ограничений в применении подходов, основанных на машинном обучении, являются недостаток данных и большие размерности необходимые для информационного описания биологических систем. В



этой связи актуальными остаются подходы, основанные на физическом моделировании биологических систем [1], а также применение комплексных экспериментально-вычислительных итеративных стратегий для дизайна природоподобных систем с заданными свойствами (цикл design-build-test-learn). Важным подходом к рациональному дизайну биосистем остается также внедрении инженерных принципов стандартизации, абстракции, модульности, ортогональности, способствующих созданию комплексных биологических систем с заданными функциями.

1. R. E. Amaro, ... A.K. Shaytan, ... M. Orozco. // Nature Methods. — 2025. — Vol. 22, no. 4. — P. 641–645

## ИНЖЕНЕРИЯ ДИНАМИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БИОПОЛИМЕРОВ

Шайтан К.В.

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова*  
*shaytan49@yandex.ru*

**Ключевые слова:** инженерия энергетических ландшафтов биополимеров, коллективные «умные» конформационные движения, эффекты симметрии кода последовательности мономеров и вязкости среды в динамике линейных полимеров, динамика фолдинга, термодинамическая устойчивость биоподобных полимеров

Линейные биополимеры (белки, ДНК, РНК и др.) являются молекулярной основой функционирования живых систем. Эти структуры отличает весьма организованное динамическое поведение, которое имеет функциональное значение. На данный момент накоплено большое количество разнообразных данных, но ситуация может быть охарактеризована примерно так – много знаем, но мало что понимаем...

В отсутствии ясности в физической картине поведения очень сложных молекулярных систем ниша постепенно заполняется формальными методами на основе ИИ, что приводит к мега обилию данных различного качества. С другой стороны, методы ИИ с использованием очень большого числа параметров и статистики не продвигают нас в направлении понимания устройства Природы, а носят важный, но прикладной характер. В глубоком бэкграунде этих методов лежит теорема Колмогорова – Арнольда о представлении функций многих переменных через линейные суперпозиции функций от сумм функций одной переменной. Эти же методы и подходы полезны и могут быть использованы при изучении физики сложных систем, свойства которых определяются многомерными поверхностями потенциальной энергии (ППЭ). Нет непроходимого барьера между методами ИИ и физикой сложного.

В работе обсуждаются принципы, по которым строится топография многомерных ППЭ для линейных биополимеров – носителей молекулярного кода.

Важным моментом является установление правил движения репрезентативной точки (РТ) по многомерной ППЭ.

Установлено, что на механической траектории в вязкой среде конформационные движения или повороты вокруг одинарных связей в цепи полимера устроены таким образом, что выполняются определенные экстремальные принципы для скорости диссипации энергии и скорости изменения потенциальной энергии макромолекулы. Как оказалось, топография ППЭ и правила движения РТ действуют синергично в направлении формирования коллективных "умных" конформационных движений в сложных системах [1].

Использование развитых представлений приводит к достаточно общим выводам относительно устройства топографии поверхности свободной энергии (ПСЭ) и возможности установления взаимосвязи между весьма разнородными экспериментальными фактами, в частности, для фолдинга белков. Достаточно четкую физическую интерпретацию получает температурная устойчивость нативного состояния и связь температуры денатурации с молекулярными особенностями мономерных звеньев. В качестве примера рассматривается возможность обнаружения биосигнатур различного состава в зависимости от температурного режима на планете.

#### Список литературы

1. Шайтан К.В. Почему белок сворачивается в уникальную 3D-структуру. И не только это... (К 100-летию академика В.И. Гольданского). Химическая физика, 2023, Т. 42, №6, С.40-62.

### **ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ: ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДО СИНТЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ**

Ямпольский И.В.

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук*  
*ivuyamp@ibch.ru*

Многие живые организмы способны излучать видимый свет. В ходе эволюции такая способность возникала несколько десятков раз, благодаря чему биолюминесцентные фермент-субстратные системы различных групп организмов биохимически не родственны друг другу. В настоящее время для двух таких систем – бактерий и высших грибов – известны полные наборы генов, необходимых и достаточных для свечения. Это создает основы для разработки технологий по переносу способности к биолюминесценции из одного организма в другой, открывая возможность для новых подходов к неинвазивному имиджингу.

В докладе будет освещена современная ситуация в области изучения природных биолюминесцентных систем и прогресс нашего научного коллектива в области переноса систем автономной биолюминесценции в другие организмы, в частности, растения.

#### Список литературы

1. An improved pathway for autonomous bioluminescence imaging in eukaryotes. E.S. Shakhova, et al. Nature Methods 2024, 21, 406.
2. A hybrid pathway for self-sustained luminescence. K. A. Palkina, et al. Science Advances 2024, 10, eadk1992.
3. Plants with genetically encoded autoluminescence. T. Mitiouchkina et al. Nature Biotechnology 2020, 944.
4. Bioluminescence chemistry of fireworm *Odontosyllis*. A.A. Kotlobay et al. PNAS USA 2019, 18911.
5. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. A.A. Kotlobay et al. PNAS USA 2018, 12728.
6. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. Z. M. Kaskova, et al. Science Advances 2017, 3, e1602847.
7. 1001 Lights: Luciferins, Luciferases, Their Mechanisms of Action and Applications in Chemical Analysis, Biology and Medicine. Z.M. Kaskova et al. Chemical Society Reviews, 2016, 6048.

8. The chemical basis of fungal bioluminescence. Purtoy K.V. et al, *Angewandte Chemie* 2015, 8124.

# ПОСТЕРНЫЕ ДОКЛАДЫ

## **А1. ВЛИЯНИЕ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ НИЗКО- И ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНЫМ СИНТЕЗОМ, НА СЕКРЕЦИЮ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ МОНОЦИТАМИ И МАКРОФАГАМИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO**

Агибалов К. А.<sup>3</sup>, Минайчев В.В.<sup>1,2</sup>, Фадеева И.С.<sup>1</sup>, Тетерина А.Ю.<sup>2</sup>, Смирнов И.В.<sup>2</sup>, Смирнова П.В.<sup>2</sup>, Шлыков М.А.<sup>2,3</sup>, Звягина А.И.<sup>1,2</sup>, Кобякова М.И.<sup>1,2</sup>, Пятина К.В.<sup>1,2</sup>, Князев С.В.<sup>1,4</sup>, Корх А.А.<sup>3</sup>, Комлев В. С.<sup>2</sup>

1. *ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН*

2. *ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН*

3. *ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова*

4. *ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»*

Кальций-фосфатные соединения (КФС) широко применяются в реконструктивной хирургии костной ткани, благодаря своей биосовместимости, остеокондуктивности и остеоиндуктивности, однако их иммуномодулирующие свойства остаются во многом неизученными. Наибольшее распространение в клинической практике получили кальций-фосфатные материалы, полученные высокотемпературным синтезом, отличающиеся высокой кристалличностью и химической стабильностью. При этом в последние годы растет интерес к кальций-фосфатным соединениям, полученным с использованием низкотемпературного синтеза в условиях, максимально приближенных к физиологическим. Предполагается, что благодаря своим структурным особенностям такие материалы будут оказывать иммунорегенеративное действие, сочетая регуляцию воспалительной реакции с активацией процессов регенерации.

Одним из важных аспектов иммуномодулирующих свойств КФС является их взаимодействие с клетками врожденного иммунитета, такими как моноциты и макрофаги. При этом секретлируемые в ответ на КФС провоспалительные цитокины способны в значительной степени определять дальнейшую реакцию организма на материал: от запуска регенеративного процесса до отторжения.

Таким образом, в данной работе в условиях *in vitro* проведено исследование иммуномодулирующих свойств КФС, полученных низкотемпературным синтезом (КФС-НТ): дикальцийфосфат дигидрата (ДКФД), октакальцийфосфат (ОКФ) и гидроксиапатита (ГАп-НТ), а также их высокотемпературных аналогов (КФС-ВТ), включающих гидроксиапатит (ГАп-ВТ) и трикальций фосфат (ТКФ-ВТ). На первичных культурах моноцитов (МЦ) и макрофагов (МФ) человека оценивали цитокиновый профиль (ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ ) КФС в стандартных (с.у.) и в провоспалительных условиях (п.у.) культивирования *in vitro*. Клетки культивировали с порошками в концентрации 1 мг/мл в течение 72ч. Для формирования п.у. часть клеток дополнительно обрабатывали 50 мкг/мл зимозана.

Результаты показали, что все КФС-НТ (ДКФД, ОКФ, ГАп-НТ) в с.у. значительно снижали секрецию провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  (более чем в 5 раз), ИЛ-6 (на 20–50%), и ФНО- $\alpha$  (в 1,7 раза и более) у макрофагов по сравнению с контролем. В п.у. низкотемпературные КФС также снижали секрецию ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ , тогда как уровень ИЛ-6 сохранялся на уровне контроля либо незначительно повышался. В то же время КФС-ВТ (ГАп-ВТ, ТКФ) увеличивали секрецию всех провоспалительных цитокинов как в с.у., так и в п.у., показывая противоположный КФС-НТ цитокиновый профиль. Полученные данные свидетельствуют, что КФС-НТ способны подавлять секрецию провоспалительных цитокинов в с.у., тогда как КФС-ВТ стимулируют их продукцию

макрофагами вне зависимости от условий культивирования. Результаты исследования создают перспективы для персонализированного подбора и разработки остеопластических материалов с учетом иммунного статуса пациента.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда РНФ в рамках проекта № 21-73-20251-П «Влияние структурных и фазовых трансформаций кальцийфосфатных соединений на механизмы биоинтеграции или отторжения материалов, предназначенных для регенерации костной ткани» с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Структурно-функциональные исследования биосистем» ИТЭБ РАН.

## А2. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ, НАСЕЛЯЮЩИХ ПОДЗЕМНЫЕ ХРАНИЛИЩА ГАЗА, И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ГЕОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ПЛАСТЕ

Алескерова Л.Э.<sup>1</sup>, Шапиро Т.Н.<sup>1</sup>, Шибзухова К.А.<sup>1</sup>, Дольникова Г.А.<sup>1</sup>, Хайдина М.П.<sup>2</sup>, Лобакова Е.С.<sup>1</sup>

1. *Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова*

2. *Российский государственный университет нефти и газа имени И.М.Губкина*  
*aleskerova.leyla@gmail.com*

**Ключевые слова:** подземные хранилища газа, биогаз, микроорганизмы

Последнее время в газовой отрасли наблюдается внедрение в инфраструктуру нехарактерных газов, таких как: водород —  $H_2$ , двуокись углерода —  $CO_2$ , сероводород —  $H_2S$ , биогаз и др. Их поступление в подземные хранилища (ПХГ) вызывают химические процессы, несвойственные для данных структур, влияющие на изменение состава природного газа и образование коррозии на оборудовании. На геохимические реакции в пласте и минералогию также существенно влияет состав, населяющих пласт, микроорганизмов. Нами в разное время были получены образцы воды из водоносных горизонтов разных скважин ПХГ. Все образцы относились к одному горизонту, но были отобраны из разных скважин, что может являться причиной различий в ионном составе, кислотности и других физико-химических параметрах. Был проведён химический анализ каждого из образцов с применением различных аналитических методов. Анализ всех образцов воды из скважин показал высокую минерализацию. Основная часть этой массы приходится на хлориды и катионы натрия, кальция и магния. На основании этих признаков все исследованные образцы воды можно отнести к хлоридно-натриево-кальциевым рассолам. Образцы проб воды из скважин пропускали через мембранные фильтры (0.2 мкм), которые в дальнейшем использовали для изучения состава, населяющих пласт, микроорганизмов. Были проведены микробиологическая (высев на селективные среды) и генетическая (метабаркодинг) оценка микробного сообщества полученных вод. ДНК накопительных культур, полученных из образцов воды, были использованы для секвенирования V4 гена 16S рРНК. Исследование показало, что экстремальные условия среды, которые формируются в скважинах ПХГ способствуют росту и заселению их видами, способными выживать в подобных условиях. Обнаружены специализированные микробные сообщества, представленные 25 родами бактерий, включающие аэробов и анаэробов: *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, которые влияют на коррозионные процессы. Бактерии, входящие в выделенные сообщества, способны к деградации ксенобиотиков, полициклических ароматических углеводородов, хлорсодержащих органических соединений и обладают потенциальной способностью к осуществлению основных метаболических путей серы. При наличии сульфата и бикарбоната в пластовой воде поступление водорода и  $CO_2$  в ПХГ может приводить к активации процессов восстановления сульфата, образования метана и ацетата подземным микробным сообществом, сопровождающихся снижением качества газа, изменением минералогии и проницаемости пород, коррозией стального оборудования. Микроорганизмы, населяющие подземные горизонты хранилища газа приспособлены к физико-химическим условиям местообитания и используют водород, метанол и другие субстраты в своем метаболизме. Это свидетельствует о необходимости исследования микробных популяций, населяющих подземные горизонты, которые предполагается использовать для закачки «зеленого» газа, содержащего водород или закачивание в пласты  $CO_2$ .

## **Б1. LYSO-RHODOPSIN КОНТРОЛИРУЕМО ПОДКИСЛЯЕТ ЛИЗОСОМЫ: ВОЗМОЖНОСТИ ОПТОГЕНЕТИКИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СОСТОЯНИЯ ЛИЗОСОМ**

Алехин В.А.\* , Назарова С.Ф., Павлов В.В., Ильинский Н.С.

*Московский физико-технический институт*

\* *alekhin.va@phystech.edu.*

**Ключевые слова:** лизосомы, оптогенетика, pH

Нарушение лизосомной функции вследствие патологического подщелачивания просвета лизосом является ключевым фактором развития ряда заболеваний, в том числе, нейродегенеративных болезней, таких как болезнь Альцгеймера [1, 2]. Подщелачивание просвета лизосом может быть обусловлено различными механизмами: ингибированием вакуолярной АТФазы (белка, в норме подкисляющего лизосомы), пермеабиллизацией лизосомной мембраны или накоплением в просвете так называемых «протонных губок» [3]. Поскольку данное состояние часто предшествует клиническому проявлению патологий, разработка методов ранней диагностики и установления причин подщелачивания лизосом представляет значительный научный и практический интерес.

В настоящей работе предложен оригинальный подход к идентификации причин лизосомного подщелачивания на основе анализа динамики pH при временном оптогенетическом подкислении лизосом с использованием lyso-Rhodopsin — слитого белка, включающего родопсин, закачивающий протоны в лизосому, и pH-чувствительный флуоресцентный репортер pHluorin. В качестве диагностических параметров использовались амплитуда снижения pH при освещении и скорость обратного подщелачивания после прекращения стимуляции.

При помощи добавок химических агентов было проведено моделирование трёх основных типов подщелачивания лизосом, вызываемых вышеперечисленными причинами. Показано, что кинетические профили pH достоверно различаются в зависимости от причины подщелачивания: при подавлении активности вакуолярной АТФазы наблюдается наибольшая амплитуда подкисления и наименьшая скорость резщелачивания, тогда как при пермеабиллизации амплитуда подкисления минимальна. Кроме того, выявлено влияние исходного уровня лизосомного pH, характерного для клеточной линии: в раковых клетках НСТ116 (характерны сильно подкисленные лизосомы) скорость восстановления pH при ингибировании вакуолярной АТФазы ниже, чем в клетках НЕК.

Полученные данные свидетельствуют о потенциале предложенного метода для дифференциальной диагностики патологических механизмов, приводящих к лизосомной дисфункции, что открывает перспективы для раннего выявления патологий, связанных с нарушением кислотности лизосом.

Работа выполнена благодаря поддержке РФФ (грант №24-24-00504, <https://rscf.ru/project/24-24-00504/>)

### **Список литературы**

1. Nixon R. A. The role of autophagy in neurodegenerative disease // Nature medicine. 2013. Vol. 19, № 8. P. 983–997.
2. Carmona-Gutierrez D. et al. The crucial impact of lysosomes in aging and longevity // Ageing research reviews. 2016. Vol. 32. P. 2–12.
3. Lee J. H. et al. Faulty autolysosome acidification in Alzheimer's disease mouse models induces autophagic build-up of A $\beta$  in neurons, yielding senile plaques // Nature neuroscience. 2022. Vol. 25, № 6. P. 688–701.



## **Б2. СОЗДАНИЕ НИЗКО-ИММУНОГЕННОЙ ЛИНИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С НОКАУТОМ ГЕНА B2M И ОЦЕНКА ЕЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК**

Антонов Д.О.<sup>1,2\*</sup>, Сосновцева А.О.<sup>2,3</sup>, Николенко В.Н.<sup>1</sup>

1. *Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)*
2. *Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии имени академика И.И. Дедова Минздрава России*
3. *Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН*

\*antonov\_d\_o@student.sechenov.ru

**Ключевые слова:** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, бета-2-микроглобулин, CRISPR/Cas9, низкая-иммуногенность, генетическая стабильность и ПСК.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) — перспективный инструмент регенеративной медицины для трансплантации и моделирования заболеваний. Их применение ограничено иммуногенностью из-за экспрессии МНС-I, вызывающего отторжение аллогенных трансплантатов [1]. Нокаут гена B2M, кодирующего бета-2-микроглобулин (компонент МНС I), снижает иммуногенность, предотвращая активацию CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [1, 2]. Однако, важным аспектом безопасности остается контроль геномной стабильности, поскольку репрограммирование и редактирование генома могут приводить к хромосомным aberrациям, соматическим мутациям и онкогенным трансформациям [4].

В данной работе получена и охарактеризована линия иПСК с нокаутом B2M. иПСК были получены путем репрограммирования фибробластов кожи здорового донора с использованием набора OKSGM (Stem Cell). Нокаут B2M проводили электропорацией (Neon Transfection System) с плазмидами, содержащими pCas9 и направляющие РНК для первого экзона B2M. После селекции колонии анализировали с помощью иммуноцитохимии (ИЦХ), проточной цитометрии (ПЦ), Сэнгер-секвенирования, для выявления инделов и нецелевых эффектов. Выживаемость иПСК оценивали при сокультивировании с аллогенными РВМС (XCelligence RTCA). Стабильность проверяли кариотипированием и анализом панели генов, связанных с пролиферацией, апоптозом и онкогенезом, с использованием секвенирования по Сэнгеру и qPCR для выявления возможных мутаций и CNV, характерных для рекуррентных aberrаций иПСК [4].

Клетки сохраняли морфологию колоний и экспрессию маркеров плюрипотентности (ИЦХ: OCT4, NANOG, SSEA4, SOX2; ПЦ: TRA-1-60+>97%), обладали способностью дифференцироваться в ткани трех зародышевых листков. Секвенирование выявило делеции со сдвигом рамки считывания в экзоне 1 B2M, с распределением -1 п.н. - 48%, -25 п.н. - 52%, приводящие к потере функции белка. ПЦ подтвердила отсутствие B2M (<0.5%). Нецелевые мутации не обнаружены. При сокультивировании с РВМС линия B2M-/- показала повышенную выживаемость: нормализованный клеточный индекс (CI)  $0.6 \pm 0.02$  против  $0.4 \pm 0.05$  у немодифицированных иПСК,  $p < 0.01$ . Кариотип нормальный (46, XX), анализ CNV и мутаций в выбранных генах не выявил aberrаций.

В рамках проведенных тестов, линия демонстрирует плюрипотентность, отсутствие рекуррентных аномалий и сниженное распознавание РВМС *in vitro*. В будущем планируется нокаут СПТА (подавление МНС-II) и модификация NK-лигандов для снижения риска CD4<sup>+</sup> Т- и NK-клеточного ответа, соответственно.

Список литературы

1. Deuse T. et al. Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade

- immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat. Biotechnol.* 2019. Vol. 37, № 3. P. 252–258.
2. Hu, X., White, K., Olroyd, A.G. *et al.* Hypoimmune induced pluripotent stem cells survive long term in fully immunocompetent, allogeneic rhesus macaques. *Nat Biotechnol* 42, 413–423 (2024).
3. Gornalusse G.G. *et al.* HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells // *Nat. Biotechnol.* 2017. Vol. 35, № 8. P. 765–772.
4. Halliwell, J., Barbaric, I. & Andrews, P.W. Acquired genetic changes in human pluripotent stem cells: origins and consequences. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 715–728 (2020).

## РАЗРАБОТКА ГИБРИДНОГО АНТИТЕЛА IgGA-ИЗОТИПА К ИНГИБИТОРУ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ДЛЯ НОВОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Ли Сююнь<sup>1,2</sup>, В.С. Рыбченко В.С.<sup>2</sup>, В.В. Аргентова<sup>1,2</sup>

1. Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносов

2. Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Шэньчжэнь

*vivargmsu@yandex.ru*

**Ключевые слова:** кросс-изотип, IgGA, PD-L1, онкотерапия

**Keywords:** cross-isotype, IgGA, PD-L1, anticancer

Традиционная терапия противораковыми антителами в основном сосредоточена на подтипах IgG, но антитела IgA обладают уникальными преимуществами в некоторых аспектах, что делает их привлекательным вариантом противоракового лечения. IgA является вторым по распространенности антителом в сыворотке крови после IgG и, согласно литературным данным, демонстрирует более эффективную противоопухолевую активность (FcaRI). Антитела IgA активируют нейтрофилы с помощью FcaRI более эффективно, чем IgG с помощью FcyR, усиливая как уничтожение опухолевых клеток, так и привлечение нейтрофилов к очагам опухоли. Гибридные антитела IgGA изотипа используют FcyR и FcaRI для усиления элиминации клеток-мишеней с помощью более мощных механизмов ADCP, ADCC и CDC по сравнению с обычными IgG-антителами. Цель нашей работы состояла в создании бифункционального рекомбинантного гибридного антитела, совмещающего эффекторные функции IgG и IgA и направленного против лиганда рецептора запрограммированной клеточной гибели1 для оптимизации и улучшения терапии онкологических заболеваний.

В данной работе нами был разработан дизайн и получены человеческие рекомбинантные антитела IgA-изотипа и гибридные IgGA-антитела, содержащие переменные доменные последовательности тяжелой и легкой цепей против лиганда рецептора запрограммированной клеточной гибели1(PD-L1), который широко экспрессируется в различных типах опухолей. Так, полученное гибридное антитело IgGA с модификациями в Fc домене, сочетает в себе характеристики IgA и IgG для усиления Fc эффекторных функций, направленных на повышение противоопухолевой эффективности.

На основе биплазмидной системы получены различные генетические конструкции, экспрессирующие тяжелую и легкую цепи иммуноглобулинов IgGA, IgA1-, IgA2m1- изотипов. Полученные конструкторы содержат переменные домены PD-L1 человеческого антитела и константные домены тяжелой цепи: только иммуноглобулина A для антител IgA1- и IgA2m1-изотипов, а в случае гибридного антитела IgGA- модифицированные кросс-изотипные CH2-CH3-константные домены тяжелых цепей иммуноглобулинов IgG1 и IgA изотипов. Исследованы характеристики экспрессии в различных клетках-хозяевах, таких как клетки CHO и HEK293. Иммуноферментный анализ подтвердил, что полученные рекомбинантные антитела кросс-изотипа IgGA и IgA изотипа против лиганда рецептора запрограммированной клеточной гибели1(PD-L1) были успешно экспрессированы в адгезионной и суспензионной культурах клеток CHO и HEK293. Иммуноглобулины изотипов IgA1, IgA2m1 и IgGA выделены из культуральной жидкости и очищены с использованием аффинной хроматографии. Был проведен иммунохимический анализ связывания кросс-изотипного анти-PD-L1-IgGA и анти-PD-L1-IgA изотипов антител с рекомбинантным человеческим белком PD-L1 с помощью ИФА. Анализ показал успешную активность связывания рекомбинантного человеческого кросс-изотипного

анти-PD-L1-IgGA и анти-PD-L1-IgA антител с рекомбинантным человеческим белком PD-L1.

Также ведется исследование оптимизации негликозилированных/гликозилированных форм антител для усиления эффекторных функций с целью разработки нового рекомбинантного антитела PD-L1-IgGA кросс-изотипа в качестве потенциальной стратегии лечения опухолей.

### Б3. PREDICTION OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS THROUGH POINT TRANSFORMER AND SPHERICAL CONVEX HULL GRAPHS

Arteaga B.D.\*, Poptsova M.S.

*HSE, International Laboratory of Bioinformatics*

*\*arteaga@hse.ru*

**Keywords:** bioinformatics, protein interactions, geometric deep learning

Accurate predictions and large-scale identification of protein-protein interactions (PPIs) are crucial for understanding their inherent biological mechanisms and protein functions in biological processes [1]. Nowadays, graph-based deep learning models have made significant contributions in modelling proteins with physicochemical and geometric features [2]. However, most of these models rely on conventional graph construction methods, such as radial cutoff or k-nearest neighbour (k-NN), which often produce sparse and weakly connected graphs, limiting the ability of neural networks to exploit the spatial relationships between nodes. To address this, we introduce PT-PPI, a geometric deep learning (GDL) framework that combines protein surfaces encoded as oriented point clouds enriched with geometric features, sparse, and well-connected graphs using the hyperparameter-free Spherical Convex Hull (SCHull) method [3]. These graphs are processed by a Point Transformer network, with representations coupled to protein sequence embeddings. Evaluations on the test set show that PT-PPI surpasses LLM-, graph-, and hybrid-based models. Ablation studies confirm the complementary value of surface geometry and sequence information, demonstrating that GDL on protein surfaces and point cloud representations offer a promising approach that opens the doors for further research on large-scale interactome mapping and the understanding of protein function.

#### Список литературы

1. Braun P., Gingras A. History of protein-protein interactions: from egg-white to complex networks // *Proteomics*. 2012. Vol. 12, P. 1478–1498.
2. Jha K. *et al.* Prediction of protein–protein interaction using graph neural networks // *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12, P. 8360.
3. Wang S. H. *et al.* A theoretically-principled sparse, connected, and rigid graph representation of molecules // *The 13th International Conference on Learning Representations*. 2025. DOI: <https://openreview.net/forum?id=OIvg3MqWX2>.

### АЗ. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ СЭМ-КЛСМ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ К БИОСОВМЕСТИМЫМ ЭЛЕКТРОФОРМОВАННЫМ МЕМБРАНАМ

Багров Д.В.<sup>1,2\*</sup>, Павлова Е.Р.<sup>2</sup>, Богданова А.С.<sup>2</sup>, Мойсенович А.М.<sup>1</sup>, Митько Т.В.<sup>2</sup>, Рамонова А.А.<sup>1</sup>, Клинов Д.В.<sup>2</sup>

1. Биологический факультет МГУ

2. ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России

\*bagrovdv@my.msu.ru

**Ключевые слова:** электроформование, сканирующая электронная микроскопия, конфокальная микроскопия, полимерное волокно

Электроформование – это способ получения тонких полимерных волокон. С его помощью можно изготавливать заготовки тканеинженерных конструкций из биосовместимых полимеров, например белков – фиброина шелка и желатина. Для исследования их структуры обычно используют метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), однако он не позволяет исследовать объем образца, и поэтому не позволяет оценить структуру пор. В данной работе предложен оригинальный метод исследования структуры, корреляционная микроскопия, объединяющая СЭМ и конфокальную лазерную сканирующую микроскопию (КЛСМ). Результатом эксперимента является пара изображений одного и того же участка поверхности образца, полученных разными методами (рисунок 1 А, Б). Для корреляционной микроскопии в состав волокон на этапе их формирования внедряли краситель; сначала использовали метод СЭМ без напыления металла, а затем для измерений методом КЛСМ помещали образец в заливочную среду.

Корреляционную микроскопию использовали для исследования волокон из фиброина (в качестве красителя использовали Hoechst 34580) и желатина (краситель FITC), и по полученным парам изображений измеряли диаметры волокон. Для фиброина наблюдалось отличное соответствие между диаметрами, измеренными методами СЭМ и КЛСМ (коэффициент корреляции  $r=0.97$ ). При малом диаметре ( $d_{СЭМ} < 200$  нм) волокон наблюдалось расхождение – самые тонкие волокна не были видны методом КЛСМ (соответствующие им диаметры отмечены вертикальными пунктирными линиями на рисунке 1 В). Для желатина диаметры большинства волокон, измеряемые методом КЛСМ, оказывались больше, чем по данным СЭМ, а коэффициент корреляции составил  $r=0.51$ . Вероятно, волокна желатина набухали и смещались при заключении в заливочную среду.

Эксперименты по корреляционной микроскопии СЭМ-КЛСМ поднимают нетривиальную задачу, связанную с анализом изображений. Результатом измерений методом КЛСМ в общем случае является z-стек (набор изображений), и напрямую сравнивать его с отдельным СЭМ-изображением невозможно. В некоторых случаях целесообразно использовать проекции максимальной интенсивности, полученные из всего z-стека или отдельных его фрагментов (рисунок 1 Б), но вообще подобный анализ требует разработки специализированных алгоритмов.

В целом, метод корреляционной микроскопии представляется перспективным для исследования микро- и наноструктуры сложных изделий, например, тканеинженерных конструкций. Он будет особенно эффективен для твердых стабильных образцов, которые не деформируются при переносе между микроскопами и помещении их в заливочную среду.

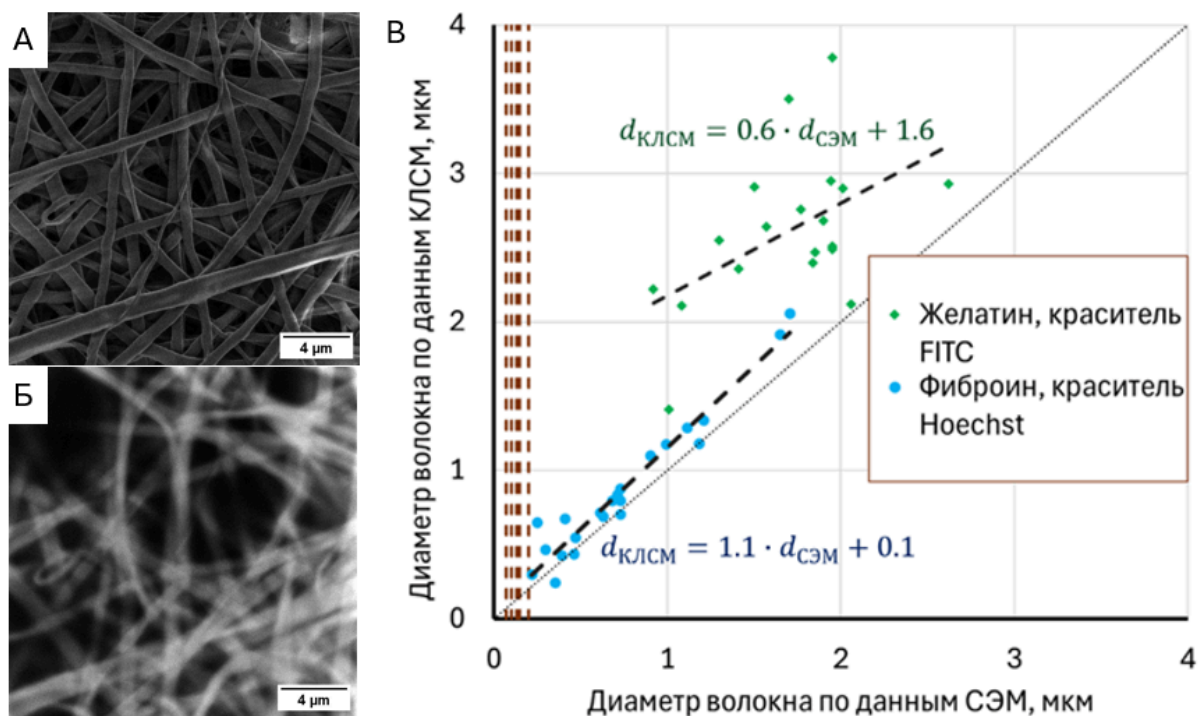


Рисунок 1 – Изображения электроформованной мембраны из фиброина шелка, полученные методами СЭМ (А) и КЛСМ (Б), а также сравнение диаметров волокон, измеренных разными методами, для мембран из фиброина и желатина (В).



#### **А4. ТРЕХМЕРНАЯ БИОПЕЧАТЬ ТКАНЕПОДОБНЫХ СТРУКТУР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

Бикмулина П.Ю.<sup>1\*</sup>, Кошелева Н.В.<sup>1</sup>, Шпичка А.И.<sup>1</sup>, Тимашев П.С.<sup>1</sup>

*1. Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия*

*\*bikmulina\_p\_yu@staff.sechenov.ru*

**Ключевые слова:** биопечать, тканевая инженерия, сфероиды

Клеточные сфероиды представляют большой интерес для тканевой инженерии и трехмерной биопечати, так как они обладают биологическими свойствами, относительно схожими с нативными тканям, и способны реактивироваться в ответ на изменяющиеся условия внешней среды. Одним из наиболее часто используемых типов клеток для 3D биопечати являются мезенхимные стромальные клетки (МСК), как в качестве отдельного типа клеток, так и в комбинации с другими. Целью данного исследования стало сравнение ключевых параметров тканеподобных структур, полученных методом 3D биопечати, на основе сфероидов из МСК в зависимости от источника клеток и состава гидрогеля.

Для 3D биопечати использовали биочернила на основе гидрогеля из желатина (7,5%) и PEG-модифицированного фибрина (2,5%), содержащие сфероиды из МСК. Биопечать проводили на экструзионном принтере BioX (CellInk, Швеция), полученные тканеинженерные конструкции культивировали до 21 дня, оценивая жизнеспособность, метаболическую активность, пролиферацию, миграцию клеток, наличие специфических маркеров.

Разработанный состав биочернил и подобранные параметры биопечати обеспечивали жизнеспособность и метаболическую активность напечатанных конструкций. Однако функциональные и морфологические свойства существенно различались в зависимости от ткани-источника клеток и геометрии тканеинженерных конструкций. Анализ и понимание этих особенностей критически важно для обеспечения высокой жизнеспособности и функциональности тканеинженерных конструкций.

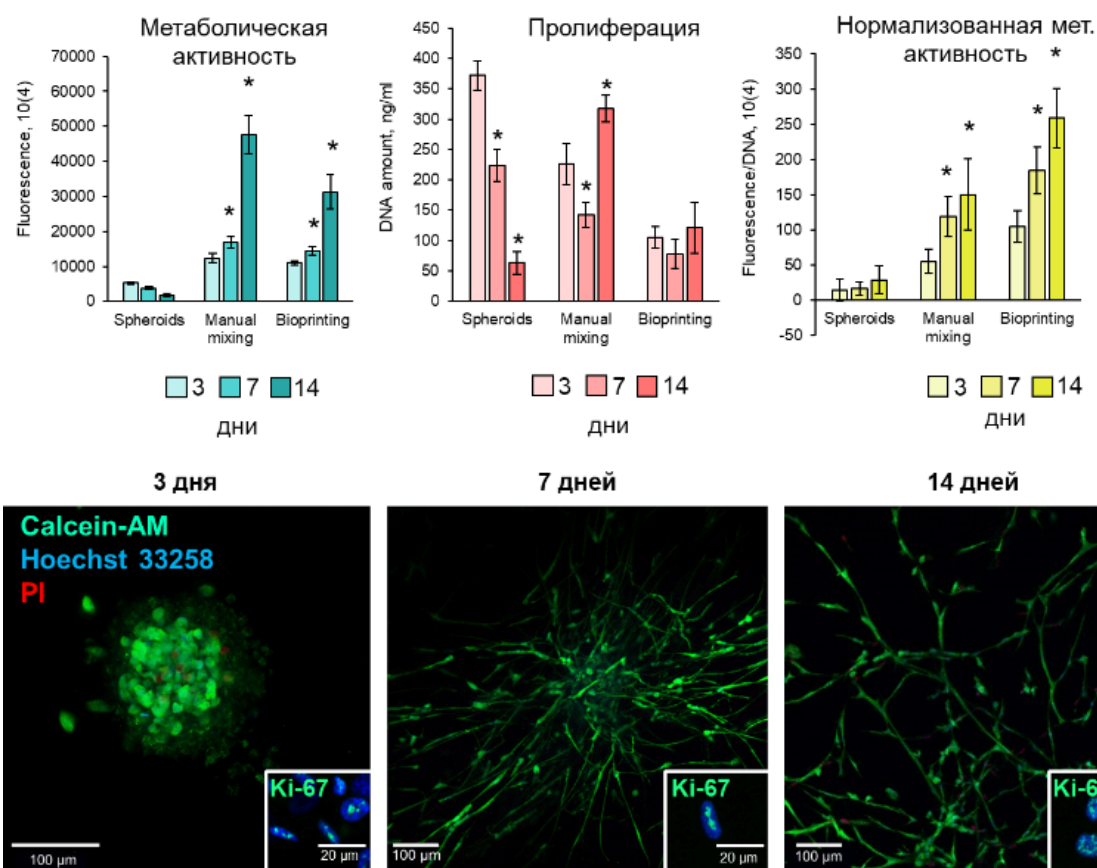


Рисунок 1. Жизнеспособность напечатанных конструкций на различных сроках и в различных условиях. Группы сравнения: Сфероиды – культивируемые в неадгезивных планшетах (контрольная группа 1), Пипетка – конструкции, смешанные вручную (контрольная группа 2), Биопринтинг – конструкции, напечатанные на экструзионном биопринтере. А – метаболическая активность, AlamarBlue тест и спектрофлуориметрия, Б - пролиферативная активность, PicoGreen тест и спектрофлуориметрия, В – нормированная метаболическая активность, полученная отношением метаболической активности (AlamarBlue тест) к количеству ДНК (PicoGreen тест), Г - жизнеспособность и морфология сфероидов через 3, 7 и 14 дней культивирования, кальцеином окрашены живые клетки (зеленый), йодидом пропидия – мертвые (красный), красителем хёхстом – ядра (синий), Ki-67 (центры активной пролиферации, зеленый), Live/Dead тест/иммуноцитохимия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. \* $p < 0.05$  относительно других образцов в группе.

## **А5. БИОИНЖЕНЕРНЫЙ СКАФФОЛД ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ ОБШИРНЫХ ДЕФЕКТОВ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ.**

Боброва М.М.<sup>1\*</sup>, Лусс А.Л.<sup>1</sup>, Куликов П.П.<sup>1</sup>, Фадеева И.С.<sup>2</sup>, Сенотов А.С.<sup>2</sup>, Минайчева В.В.<sup>2</sup>, Тетерина А.Ю.<sup>2</sup>, Кобякова М.И.<sup>3</sup>, Кескинов А.А.<sup>1</sup>

*1. Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального Медико-Биологического Агентства.*

*2. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.*

*3. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова.*

*\*MBobrova@cspfmbar.ru.*

**Ключевые слова:** бионженерный скаффолд, коллаген, гиалуронат натрия, дефекты мышечной ткани

Травмы, резекции опухолей и дегенеративные заболевания могут привести к обширным дефектам скелетных мышц, а следовательно, к функциональным нарушениям и тяжелой инвалидности. В последние десятилетия были разработаны различные стратегии тканевой инженерии скелетных мышц, однако, по-прежнему наблюдается высокий спрос на разработку новых высокоэффективных методов и материалов, способствующих функциональной регенерации, которые могли бы быть использованы при терапии мышечных дефектов в клинической практике [1].

Целью исследования являлась разработка медицинского изделия (бионженерного скаффолда) на основе полимерного гидрогеля для заживления обширных дефектов скелетных мышц. Разрабатываемые методы создания биосовместимых конструкций на основе полимерного гидрогеля и способ их модификации позволят расширить спектр препаратов, доступных для клинического применения, что будет способствовать повышению качества жизни пациентов и снижению инвалидизации населения.

Была разработана методика получения бионженерного скаффолда, способствующего регенерации скелетных мышц. Были изучены физико-химические и биологические свойства полученной конструкции. Модифицированный скаффолд представляет собой слоистую конструкцию на основе комбинации натуральных полимеров, коллагена и гиалуроната натрия с добавлением сшивающих агентов для формирования слоев с различными сроками резорбции и протеолитической деградации.

Для оценки биологических свойств скаффолдов были проведены исследования, включающие анализ цитотоксического действия и анализ влияния пористого бионженерного скаффолда на пролиферативную активность клеток. В результате проведенных *in vitro* тестов на клетках линий C2C12 (ATCC CRL-1772), CCL 163 (Balb/3T3 клон A31) и CCL 1 (NCTC клон 929) было установлено, что разработанный бионженерный скаффолд не оказывает цитотоксического действия и обладает высоким уровнем биосовместимости. В эксперименте по оценке иммуотропных свойств конструкции было показано снижение ЛПС-индуцированной внутриклеточной продукции АФК клетками при их инкубировании на образцах пористого бионженерного скаффолда.

Биосовместимость разработанного бионженерного скаффолда была изучена в модели гетеротопической имплантации под кожу крысам породы Wistar. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии общетоксического влияния на организм экспериментальных животных и безопасности потенциального применения бионженерного скаффолда в клинических условиях.

Исследование эффективности биоинженерного скаффолда было проведено в модели ортотопической имплантации полученных изделий в мышечный дефект передней большеберцовой мышцы крысы. В ходе данного эксперимента было продемонстрировано, что спустя 4 недели после имплантации 50% образцов скаффолда деградировали. Также показаны признаки полноценной стадии ремоделирования в ходе репаративного гистогенеза мышечной ткани. При этом признаков жирового или фиброзного перерождения выявлено не было. Полученные данные свидетельствуют об эффективности биоинженерного скаффолда в *in vivo* модели обширного дефекта мышечной ткани.

Работа выполнена при поддержке Федерального медико-биологического агентства в рамках Государственного задания № 388-00083-25-00 Федеральным государственным бюджетным учреждением «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства.

#### Список литературы

1. Liu J. et al. Current Methods for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration // BioMed Research International. 2018. Vol. 2018. 1984879

#### **Б4. РЕКОНСТРУКЦИЯ ОСЕВОЙ ФИБРИЛЛЫ STX-КОНВЕРТИРУЮЩЕГО БАКТЕРИОФАГА $\phi$ HI24B С ПОМОЩЬЮ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

М.А. Бубенчиков<sup>1</sup>, А.В. Моисеенко<sup>1</sup>, И. Чжан<sup>1,2</sup>, А.С. Кузнецов<sup>3</sup>, А.В. Летаров<sup>3</sup>, О.С. Соколова<sup>1,2</sup>

1. *Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия*

2. *Биологический факультет университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне, КНР*

3. *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия*

**Ключевые слова:** криоэлектронная микроскопия, бактериофаги, адсорбционный аппарат

Бактериофаг  $\phi$ HI24B (Traversvirus tv24B) относится к подовирусному морфотипу и входит в группу Stx-конвертирующих лямбдоидных фагов (Stx-фагов). Данная группа вирусов играет значительную роль в патогенезе эшерихиозов – тяжелых заболеваний человека, вызываемых патогенными штаммами бактерий кишечной микрофлоры. Лизогенная конверсия *Escherichia coli* Stx-конвертирующим фагом превращает клетку-хозяина в потенциального продуцента шигоподобного токсина, то есть в STEC-форму [1]. Это, в свою очередь, служит причиной развития тяжелых, нередко летальных токсикоинфекций, которые проявляются в виде диареи, геморрагического колита и гемолитико-уремического синдрома (ГУС) [2].

Широкое распространение профагов, родственных  $\phi$ HI24B, в геномах STEC, по-видимому, связано с их способностью распознавать высококонсервативный рецептор *E. coli* – белок внешней мембраны *VamA* [3]. Тем не менее, рецептор-связывающие белки вирионов, которые обеспечивают взаимодействие с *VamA* или другими клеточными рецепторами, до сих пор не идентифицированы [4], а структуры адсорбционных аппаратов соответствующих бактериофагов остаются малоизученными. Особого внимания заслуживает уникальное строение вириона  $\phi$ HI24B, которое отличает его как от типичных лямбдоидных фагов, так и от большинства других подовирусов, инфицирующих *E. Coli* [5,6].

Методы криоэлектронной микроскопии и микроскопия в негативном контрасте были использованы для исследования структуры адсорбционного аппарата  $\phi$ HI24B, в частности комплекса осевой фибриллы *gp56* и сопла *gp57*. Было установлено, что тример *gp56* взаимодействует с гексамером *gp57* таким образом, что N-концевой домен *gp56* располагается в канале, образованном бета-пропеллерными и нижними бета-сендвичными доменами *gp57*. Остальная часть белка *gp56* обладает значительной подвижностью и располагается в окружающем конец хвоста пространстве, что осложняет получение его полной трехмерной реконструкции. Первичная структурная модель комплекса из тримера *gp56* и гексамера *gp57*, построенная с помощью AlphaFold 3 [7], продемонстрировала хорошую корреляцию с экспериментальными данными, в частности на двумерных классах. Применение подхода расширения симметрии и локального уточнения ориентаций позволило получить карту рассеивающего потенциала для осевой фибриллы и визуализировать третичную структуру её глобулярных доменов, непосредственно участвующих во взаимодействии с белками сопла с общим разрешением около 7.4 Å.

Препарат бактериофага наносили на сетки с перфорированной углеродной подложкой Quantifoil R1,2/1,3, которые предварительно гидрофилизировали в тлеющем разряде, и замораживали в жидком этане при температуре  $-180^{\circ}\text{C}$  с использованием системы Vitrobot Mark IV (ThermoFisher Scientific, США). Данные получали на

криоэлектронном микроскопе Titan Krios (ThermoFisher Scientific, США) при ускоряющем напряжении 300 кВ и дефокусировке объективной линзы в диапазоне от  $-0,5$  до  $-2,5$  мкм. Увеличение соответствовало калиброванному размеру пикселя  $0,83 \text{ \AA}$  на детекторе K3 (Gatan, США). Суммарная доза электронного облучения каждого поля зрения не превышала  $55 \text{ e-/}\text{\AA}^2$ .

#### Список литературы

1. Allison HE. Stx-Phages: Drivers and Mediators of the Evolution of STEC and STEC-Like Pathogens. *Future Microbiol.* 2007;2(2):165–74.
2. Beutin L, Martin A. Outbreak of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 Infection in Germany Causes a Paradigm Shift with Regard to Human Pathogenicity of STEC Strains. *Journal of Food Protection.* 2012;75(2):408–18.
3. Smith DL, Wareing BM, Fogg PCM, Riley LM, Spencer M, Cox MJ, и др. Multilocus characterization scheme for shiga toxin-encoding bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(24):8032–40.
4. Golomidova AK, Efimov AD, Kulikov EE, Kuznetsov AS, Belalov ISh, Letarov AV. O antigen restricts lysogenization of non-O157 *Escherichia coli* strains by Stx-converting bacteriophage phi24B. *Sci Rep.* 2021;11(1):3035.
5. Кузнецов АС, Моисеенко АВ, Куликов ЕЕ, Летаров АВ. Изучение трехмерной структуры вириона Stx-конвертирующего бактериофага  $\phi 24b$  методами криоэлектронной микроскопии. *Микробиология.* 2024;93(3):336–9.
6. Bubenchikov M, Zhang R, Moiseenko A, Kuznetsov A, Letarov A, Sokolova OS. Cryo-EM Reconstruction of Tail and Capsid of Stx Bacteriophage Phi24B. *Microscopy and Microanalysis.* 2024;30(Supplement\_1):ozae044.378.
7. Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, и др. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* [Электронный ресурс]. 2024; URL: <https://www.nature.com/articles/s41586-024-07487-w> (дата обращения: 09.06.2024).

## **Б5. ДИЗАЙН ГЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЭКСПОНИРОВАНИЕ АНТИГЕНА НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТКИ НА ПРИМЕРЕ S-БЕЛКА SARS-COV-2**

Буркова Е.Е.<sup>1\*</sup>, Переверзев И.М.<sup>1</sup>, Бахно И.А.<sup>1</sup>, Яковлева К.И.<sup>1</sup>, Довыденко И.С.<sup>1</sup>

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

*\*burkova199102@gmail.com*

**Ключевые слова:** S-белок SARS-CoV-2, цитоплазматический домен, 3'-НТО мРНК

В случае использования мРНК-вакцин для создания стойкого иммунитета недостаточно соблюдения таких условий как стабильность доставляемой мРНК и высокой эффективности трансляции антигена. Также необходима высокая представленность антигена на поверхности клеток. Для некоторых вирусов не требуется дополнительной модификации мРНК антигена для экспонирования белка на поверхность, а для других белок может оказаться запертым внутри клетки. S-белок SARS-CoV-2 не исключение. В ходе созревания вирионы SARS-CoV-2 проходят через секреторный путь в ERGIC, затем через комплекс Гольджи и антероградную систему, после чего высвобождаются из клеток-хозяев. S-белок содержит сигнальную последовательность в цитоплазматическом хвосте, направляющую его в ЭПР, которая необходима для прохождения через ERGIC. Поэтому основная часть S-белка задерживается во внутри клетки. Во время COPI-ретроградного и COPII-антероградного транспорта происходит утечка S-белка на поверхность клетки.

Принимая во внимание вышеизложенное, важным является рациональное распределение антигена в клетке, в данном случае S-белка коронавируса SARS-CoV-2, с большой вероятностью это может позволить снизить дозу вводимой вакцины, что возможно приведет к минимизации побочных эффектов вакцины.

Основной целью настоящей работы являлся дизайн плазмидных конструкций, кодирующих S-белок SARS-CoV-2, обеспечивающий необходимый уровень стабильности мРНК в клетке, высокий уровень экспрессии иммуногенного белка, и его доступность для клеток иммунной системы (экспонирование на поверхности клеток) с целью формирования иммунного ответа организма. В работе были сконструированы и собраны плазмидные конструкции, кодирующие S-белок с различными модификациями цитоплазматического хвоста, и содержащие 3'-НТО различных белков. Кроме того, проведен дизайн 3'-НТО: включение цис-элементов из 3'-НТО мРНК белка CD47, необходимых для рекрутирования белков HuR, SET и RAC1, ответственных за импорт белка к плазматической мембране. Показано, что включение цитоплазматического домена трансмембранного белка CD47, а также цис-элемента ARE из 3'-НТО мРНК белка CD47, повышает не только экспрессию S-белка в клетках HEK293 FT, но и приводит к увеличению экспонирования белка на поверхности клеток по сравнению с немутантным S-белком или S-белком с мутациями K1269A и H1271A в мотиве KLNHT цитоплазматического домена.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-20074; <https://rscf.ru/project/24-24-20074/> в рамках поддержанного Правительством Новосибирской области проекта № р-74.



## А6. ПРИРОДНЫЕ БИОПОЛИМЕРЫ: ЛИГНИНСОДЕРЖАЩИЕ ГИДРОГЕЛИ В ПРИРОДООХРАННЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ

Тарасова Д.А.<sup>1\*</sup>, Вахрушева П.А.<sup>1</sup>, Черенков И.А.<sup>1</sup>

*1. Удмуртский государственный университет*

*\*dashatarasova20@mail.ru*

**Ключевые слова:** лигнин, гидрогелевые носители, иммобилизация

Отходы деревообрабатывающих производств, содержащие лигнин, представляют собой серьёзную экологическую проблему для многих регионов России: технологический процесс обработки лигнина требует значительных энергетических ресурсов, а его комплексное использование до сих пор остаётся сложной задачей [1]. Одним из немногих примеров его эффективного использования в природоохранной биотехнологии является создание лигнин содержащих биodeградируемых гидрогелевых материалов для дальнейшей иммобилизации микробных клеток. Такое состояние клеток близко к естественным условиям, поскольку гель имитирует матрикс биоплёнок [2-4]. Таким образом, одной из ключевых задач остаётся разработка гидрогелевых носителей для биомассы и изучение их физико-химических свойств [2].

Целью работы стало исследование физико-химических свойств биосовместимых гидрогелей на основе поливинилового спирта (ПВС), альгината натрия (АН) и лигнина для иммобилизации клеток.

В результате работы были получены гидрогели путём сшивания синтетической полимерной матрицы из ПВС, АН и лигнина (рисунок 1): такие конструкторы обладают плотной структурой. Лигнин эффективно сочетается с гелеобразующими веществами, а благодаря своей устойчивости к биodeградации, он способствует длительному разложению конструкторов.

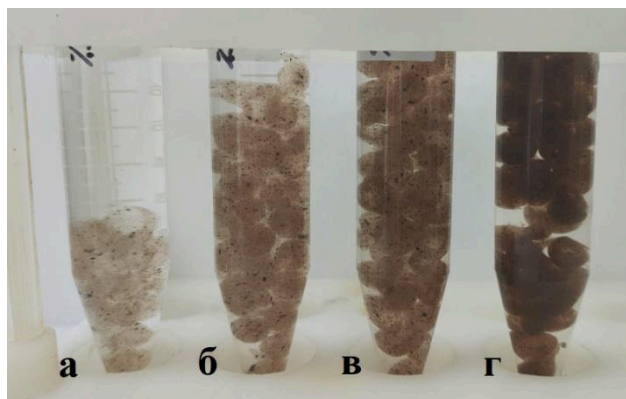


Рис. 1 Гидрогели на основе лигнина: а) ПВС/АН/лигнин (0,25%), б) ПВС/АН/лигнин (0,50%), в) ПВС/АН/лигнин (1%), г) ПВС/АН/лигнин (2%).

Установлено, что гидрогели с 0.5–1% лигнина демонстрируют наилучшие физико-химические свойства: высокая механическая прочность, стабильность формы и биосовместимость. Гидрогель ПВС/лигнин 1%/АН обладает максимальной степенью набухания (22.5 г/г) и влагосодержанием (92.5%). Внутренняя структура гидрогелей пористая и однородная, что подтверждено микроскопией срезов.

Были изучены гидратационные и сорбционные свойства полученных носителей на стандартном растворе метиленового синего. Результат исследования дает основание предполагать наибольшую адекватность представления сорбционных характеристик гидрогелевых носителей с лигнином с использованием математической модели Фрейндлиха, согласно которой адсорбция происходит на гетерогенном слое сорбента с

неопределенным количеством активных центров связывания. Также проведён анализ ИК-Фурье спектров компонентов гидрогеля и самого гидрогеля с включенным в состав лигнином, который подтверждает образование межмолекулярных связей между компонентами композита.

Таким образом, экспериментально подтверждена возможность создания гидрогелевых носителей на основе поливинилового спирта и альгината натрия с добавлением лигнина. Изучены их физико-химические характеристики. Эти материалы обладают потенциалом для формирования конструкций различной формы для иммобилизации биомассы и создания искусственного неклеточного матрикса, имитирующего биопленки. Включение лигнина позволяет регулировать время разложения и гидродинамическую устойчивость структур, что делает их пригодными для биоремедиации сточных вод.

#### Список литературы

1. Феофилова Е. П., Мысякина И. С. Лигнин: химическое строение, биodeградация, практическое использование (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52. – №. 6. – С. 559-569.
2. Lieleg O., Ribbeck K. Biological Hydrogels as Selective Diffusion Barriers // Trends Cell Biol. 2011. Vol. 21. P. 543-551.
3. Chaves S. et al. Control of microbial biofilm formation as an approach for biomaterials synthesis // Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2020. Vol. 194.
4. Wang P.H., Chang Y.R., Lee D.J. Shape stable poly(vinyl alcohol) hydrogels with immobilized activated sludge at repeated dry-rewet cycles // Bioresour. Technol. 2019. Vol. 289. P. 121662.

## А7. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ ФАБРИКАЦИЯ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ГИДРОГЕЛЕВЫХ КОНСТРУКТОВ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Вахрушева Ю. С.<sup>1\*</sup>, Черенков И. А.<sup>1</sup>

1. Удмуртский государственный университет

\*vakhrusheva8078@gmail.com

**Ключевые слова:** гидрогелевые материалы, альгинат натрия

Разработка гидрогелевых материалов является актуальной задачей в сфере биоинженерии. Особый интерес представляют методы по созданию трехмерных гидрогелевых структур заданной формы, позволяющих иммобилизовать живые клетки. Гидрогели на основе альгината натрия, благодаря биосовместимости являются перспективным материалом для создания трехмерных структур и открывают возможности для моделирования биосистем [1]. Традиционные методы получения гидрогелей сложны в исполнении и не позволяют в полной мере контролировать геометрию конструкций.

Целью работы являлась разработка метода электрохимической фабрикация конструктов из альгинатных гелей, а также исследование возможности иммобилизации в гидрогель клеток водорослей *S. quadricauda*.

Для приготовления гидрогелей использовали альгинат натрия 1%, карбонат кальция 2%, поливиниловый спирт 0,5%. Гидрогели с водорослями получали с добавлением взвеси *S. quadricauda* к раствору гелеобразователя. Формировали конструкты электрохимическим осаждением на аноде, используя в качестве рабочего электрода графитовые и платиновые электроды толщиной 0,1-0,5 мм. Анализ диффузионной проницаемости гидрогелей проводили методом циклической вольтамперометрии в диапазоне +200...-900 мВ, используя электроактивный краситель толуидиновый синий в концентрации  $10^{-3}$  М.

Данный метод позволяет получать на поверхности рабочего электрода гидрогелевые конструкции. На циклических вольтамперограммах наблюдается стабильный отклик толуидинового синего: катодный пик в диапазоне потенциалов -300...-400 мВ, анодный – в -250...-350 мВ. При диффузии красителя наблюдается линейный рост тока, что говорит о хорошей диффузионной проницаемости гидрогеля для небольших органических молекул. Введение клеток в гель способствовало увеличению пиковых токов, характеризующих электрохимические превращения толуидинового синего.

Таким образом, представленный метод демонстрирует простое получение гидрогелей на основе альгината натрия с перспективой придания определенной формы конструкту. Оптимальными условиями являлись напряжение 3В, время экспозиции 3-5 минут. Метод может стать основой для дальнейшего изучения биосовместимых гидрогелей, что делает его перспективным в областях биотехнологии, требующих контролируемой иммобилизации клеток.

### Список литературы

1. Ino, K. Biofabrication Using Electrochemical Devices and Systems / F. Ozawa, N. Dang et al.// Adv Biosyst. – 2020.4(4)
2. Lee, B. Shape and size of calcium alginate beads produced through extrusion dripping method: A review / B. Lee, Ravindra P.// Chemical-Engineering-Technology – 2013. 36(10)

## Б6. ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ CpG-ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ ЧИСТОТЫ

Бушина Л.Г.<sup>1</sup>, Герасимов О.А.<sup>\*1</sup>, Козлов И.Б.<sup>1</sup>

*1. ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва*

*\*ogerasimov@cspfmba.ru*

**Ключевые слова:** иммуностимуляторы, CpG-олигонуклеотиды.

Синтетические CpG-олигодезоксинуклеотиды (CpG ODN) – представляют собой перспективный класс молекул, обладающих способностью активировать врожденный иммунитет за счет взаимодействия с рецепторами TLR (Toll-like-рецепторами). Благодаря этому свойству, они активно изучаются и применяются как адъюванты и терапевтические агенты в онкологии и при лечении инфекционных заболеваний. Для проведения *in vivo* исследований требуется обеспечить высокую степень чистоты CpG ODN, поэтому одним из ключевых этапов получения функционального CpG ODN является стадия хроматографической очистки, так как синтез сопровождается образованием различных побочных продуктов.

Межнуклеотидные связи синтезированного CpG ODN полностью фосфотиоатные (PS) что обуславливает повышенную гидрофобность этих соединений и приводит к ряду технологических сложностей в процессе очистки. Подобные молекулы характеризуются относительно сильным удерживанием, по сравнению с олигонуклеотидами с нативными межнуклеотидными связями, на обращенно-фазовых колонках, таких как C18, что может приводить к недостаточно успешному разделению с близкими по структуре примесями (n-1). Это особенно актуально при использовании водно-органических градиентов с низким содержанием органического растворителя.

Мы разработали эффективную методику очистки CpG ODN с помощью обращенно-фазовой хроматографии (ОФ-ВЭЖХ), позволяющую получить продукт синтеза высокой степени чистоты.

Хроматографическая очистка проводилась на жидкостном хроматографе с использованием градиентного режима от 0 до 15% буфера В в течение 40 минут на колонке с обращенно-фазовым сорбентом C18.

В качестве подвижной фазы использовался 20 mM раствор бикарбоната аммония ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) (pH=8) и ацетонитрил ( $\lambda=260$  нм).

Полученный олигонуклеотид анализировали методом ВЭЖХ-МС для подтверждения соответствия детектированной молекулярной массы синтезированного олигонуклеотида расчётной молекулярной массе, а также для определения процентного содержания целевого продукта.

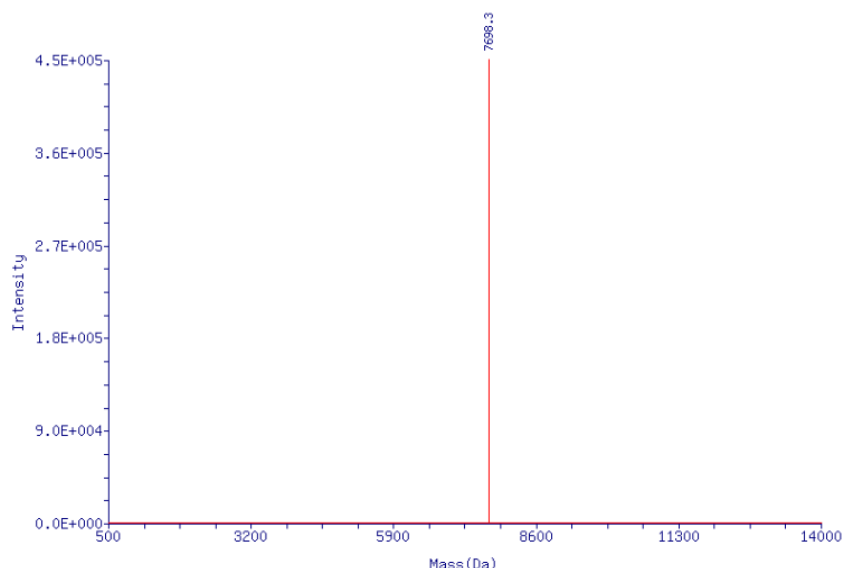


Рисунок 1. Деконволютированный спектр CpG ODN.

Полученный масс-спектр был деконволютирован с помощью специализированного программного обеспечения. Детектированная молекулярная масса 7698.3 Da. соответствует расчетной молекулярной массе образца (рис. 1).

Разработанный нами метод хроматографической очистки показал высокую эффективность в отделении целевого продукта от примесей и побочных продуктов синтеза. Полученный олигонуклеотид характеризовался высокой степенью чистоты, что было подтверждено методом ВЭЖХ-МС.

Данная методика может быть успешно использована для получения CpG ODN для терапевтических целей и других биологических применений, обеспечивая высокое качество препаратов на их основе для исследований.

Благодарности: коллектив авторов выражает благодарность Ольге Юрьевне Домашевой за вклад в разработку представленной методики в части выполнения ВЭЖХ-МС анализа образцов CpG-олигонуклеотидов.

## А8. ДВУХСЛОЙНЫЕ ПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНОГО КОМПЛЕКСА ХИТОЗАНА И ГИАЛУРОНАТА НАТРИЯ С ГЕНТАМИЦИН СУЛЬФАТОМ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Глебская С. А.<sup>1</sup>, Олексенко В. Р.<sup>1</sup>, Грибиниченко Т. Н.<sup>1</sup>

*1. Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Российская Федерация*

*\*glebskaia@itmo.ru*

**Ключевые слова:** гиалуронат натрия, хитозан, гентамицин сульфат

Актуальной задачей регенеративной медицины является разработка биорезорбируемых материалов на основе биополимеров. В данной работе исследованы двухслойные пленки на основе полиэлектролитного комплекса (ПЭК) гиалуроната натрия и хитозана, модифицированного гентамицин сульфатом. Выбор полимеров обусловлен их биосовместимостью, низкой иммуногенностью и способностью к биодеградации [1,2], а включение гентамицин сульфата придает системе необходимые антибактериальные свойства [3].

Пленки формировали последовательным нанесением на подложку раствора гиалуроната натрия (молекулярная масса 1,29 мДа, 0,25–0,5% мас.) и хитозана (молекулярная масса 0,2 мДа, 1,75–3,5% мас.) с добавлением уксусной кислоты до 2%. В раствор хитозана предварительно вводили 5% гентамицин сульфата от массы полимера. После нанесения каждого слоя проводили сушку при 37°C (24 ч), затем образцы термообработывали при 100°C (5 мин) для перекристаллизации. Полученные пленки хранили в эксикаторах при относительной влажности 30% и 70%.

Метод ИК-Фурье-спектроскопии зафиксировал сдвиги и уменьшение интенсивности полос поглощения, характерных для валентных колебаний аминогрупп –NH<sub>2</sub> хитозана (1650 см<sup>-1</sup>) и карбоксильных групп –COOH гиалуроната натрия (1410 см<sup>-1</sup>), что подтверждает образование ионных связей между полимерами и формирование ПЭК. Оптическая микроскопия показала, что равномерная структура пленок без макродефектов достигается при соотношении концентраций гиалуроната натрия и хитозана 1:7 и температуре термостатирования 37°C. Отклонение от этих параметров приводило к образованию агрегатов или неполному пленкообразованию. Толщина пленок варьировала в пределах 0,4 мкм и зависела от числа слоев и продолжительности термостатирования. Важным критерием выступила влажность хранения: при влажности ниже 30% наблюдалось локальное растрескивание и снижение пластичности, а выше 70% – неравномерное высыхание и уменьшение прочности пленок.

Введение гентамицин сульфата не нарушало структуру ПЭК, но формировало градиент распределения антибиотика и увеличивало толщину пленок вследствие образования дополнительного комплекса между антибиотиком и гиалуронатом натрия. УФ-спектроскопии показала двухфазное высвобождение гентамицин сульфата из пленок: начальное быстрое высвобождение последующей пролонгированной диффузией через матрицу.

### Список литературы

1. Yasin, A. et al. Advances in hyaluronic acid for biomedical applications // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022. Vol. 10.
2. Aranaz I. et al. Chitosan: an overview of its properties and applications // *Polymers*. 2021. Vol. 13, № 19.
3. Supernak M. et al. Chitosan-based membranes as gentamicin carriers for biomedical applications – influence of chitosan molecular weight // *Membranes*. 2023. Vol. 13, №

## **Б7. СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ НОКАУТА И ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА РЕЦЕПТОРА СМЕРТИ DR5**

Гомбоева Д.А.<sup>1</sup>, Исакова А.А.<sup>1,2</sup>, Гаспарян М.Э.<sup>2</sup>, Яголович А.В.<sup>1</sup>

*1. Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова*

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

*\* gomboevada@my.msu.ru*

**Ключевые слова:** DR5, нокаут, гиперэкспрессия, клеточная линия

Рецептор смерти DR5 играет ключевую роль в индукции апоптоза цитокином TRAIL, эффектором противоопухолевого иммунитета, и является перспективной терапевтической мишенью благодаря повышенной экспрессии в опухолевых клетках. Однако резистентность первичных опухолей зачастую приводит к недостаточной эффективности препаратов-агонистов DR5 [1]. Это требует создания специфических клеточных моделей для изучения механизмов активации сигнальных путей рецептора DR5, верификации мишени и анализа нецелевых эффектов препаратов. Цель работы заключалась в создании клеточных моделей нокаута и гиперэкспрессии гена рецептора смерти DR5 на основе клеточной линии HEK293T.

Нокаут гена DR5 был произведен с использованием геномного CRISPR-Cas9-редактирования. Для этого были сконструированы генетические конструкции, экспрессирующие Cas9 и направляющие РНК (нРНК) к экзонам 1 и 4 целевого гена DR5. Гиперэкспрессию гена DR5 проводили путем клонирования последовательности ДНК, кодирующей DR5, в вектор pcDNA3.1(+) и последующей трансфекции. Валидация моделей с помощью ОТ-ПЦР показала зависимость эффективности нокаута от используемой нРНК: нРНК, комплементарная экзону 4, привела к полному нокауту, в то время как нРНК к экзону 1 оказалась неэффективной. Клеточная модель гиперэкспрессии показала значительное увеличение уровня мРНК гена DR5 по сравнению с контролем. Разработанная методика нокаута и гиперэкспрессии DR5 на основе линии HEK293T может быть транслирована на получение модельных клеточных линий на основе опухолевых клеток различного генеза.

### **Список литературы**

1. Shlyakhtina, Y., et al. Dual role of DR5 in death and survival signaling leads to TRAIL resistance in cancer cells // Cell Death & Disease. 2017. Vol. 8, №8. P. 3025.

## А9. РАЗРАБОТКА БИОМАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА МЕДУЗ АЗОВСКОГО МОРЯ

Гордеева Ю. П.<sup>1\*</sup>, Середа А.А.<sup>1</sup>, Головин С.Н.<sup>1</sup>

*1. Донской государственный технический университет*

**Ключевые слова:** биотехнология, биоинженерия, коллаген, медузы *Rhizostoma pulmo*

Рынок биосовместимых материалов составил в 2021 году 13,7 миллиарда долларов, по прогнозам, к 2030 году будет достигать 35,2 миллиарда долларов. Особое место среди таких материалов занимает коллаген, являющийся структурным белком, используемым в регенеративной медицине, косметологии и тканевой инженерии [1]. Традиционные источники коллагена животного происхождения, к которым относят как правило коллаген крупного рогатого скота, сопряжены с рядом ограничений, включающих риск передачи прионных заболеваний, высокую аллергенность и религиозно-этические барьеры. В связи с этим поиск альтернативных и безопасных источников коллагена представляет собой актуальную научную задачу. Перспективным направлением является использование медуз Азовского моря, биомасса которых обширна, возобновляема и не задействована в промышленном обороте [2,3].

Цель работы заключалась в разработки аналогов биоматериала, содержащих животный коллаген из коллагена медуз.

Разработана и опробована технология получения чистого коллагена из медуз *Rhizostoma pulmo*, которая включала промывку и транспортировку сырья, механическое измельчение и удаление примесей. Экстракция проводилась с помощью уксусной кислоты с последующей очисткой и лиофилизацией. Стерилизация осуществлялась с помощью воздействия ультрафиолетовых лучей, что позволило сохранить нативные свойства белка.

Важным практическим результатом явилось получение различных форм биоматериала: гели, губки, плёнки, пористые губчатые структур, биочернила, покрытия для культуральной посуды и лиофилизированные порошки (Рис.1.). Продукты из коллагена были получены из гидрогеля в лиофильной сушке под воздействием таких факторов как низкая температура и давление. Полученные продукты из коллагена обладают прикладным потенциалом для применения в области ветеринарии и медицины.



Рис.1. Биоматериалы на основе коллагена медуз *Rhizostoma pulma*

Результаты исследования пленок методом трансмиссионной электронной микроскопии показали, что полученный белок сохраняет характерную для коллагена фибриллярную структуру, типичную для нативного коллагена I типа.



Иммуногистохимический анализ был направлен на выявление синтеза виментина у клеток, заключенных в коллагеновый матрикс, что доказывает его биосовместимость. Для подтверждения чистоты и молекулярной структуры выделенного коллагена был проведен электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Полученные результаты показали наличие характерных полос, соответствующих  $\alpha$ -цепям коллагена, а также  $\beta$ - и  $\gamma$ -димеров. Микробиологические исследования подтвердили санитарную безопасность образцов и отсутствие патогенной микрофлоры.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-75-10137,

#### Список литературы

1. Ezati P. et al. Recent Advances in Collagen and Collagen-Based Packaging Materials: A Review //ACS Food Science & Technology. – 2025. – Т. 5. – №. 5. – С. 1767-1784.
2. Tan A. et al. The role of animal health components in a biosurveillance system: concept and demonstration //Agriculture. – 2023. – Т. 13. – №. 2. – С. 457.
3. Мирзоян З. А. и др. Развитие популяций сцифоидных медуз *Rhizostoma pulmo* и *Aurelia aurita* в Азовском море //Водные биоресурсы и среда обитания. – 2019. – Т. 2. – №. 2. – С. 27-35

## **Б8. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ ХРОМАТИНА ЧЕЛОВЕКА, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ГЕНОМА: АНАЛИЗ МЕТОДАМИ БИОИНФОРМАТИКИ**

Грибкова А. К.<sup>1,2\*</sup>, Армеев Г.А.<sup>1,2</sup>, Шайтан А.К.<sup>1,2</sup>

1. Биологический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова

2. Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Москва, Россия

\*[akgribkova@gmail.com](mailto:akgribkova@gmail.com).

**Ключевые слова:** хроматин, хроматом, биоинформатика

Хроматин — это комплекс ДНК и белков, обеспечивающий компактную упаковку генетического материала в ядре клетки. При этом хроматин играет ключевую роль в функционировании генома, участвуя в различных физико-химических процессах через ассоциированные с ним белки. К таким процессам относятся, например, ремоделирование хроматина за счет энергии АТФ, формирование функциональных немембранных конденсатов посредством слабых мультивалентных взаимодействий. Однако представление о разнообразии и свойствах белковой составляющей хроматина до сих пор остается неполным. В базах данных о локализации белков отсутствует консенсус относительно положения хроматина в онтологии ядерных субкомпартов. При этом методами масс-спектрометрии идентифицируется от нескольких сотен до нескольких тысяч белков хроматина. Этот пробел затрудняет формирование целостного понимания механизмов функционирования генома.

В рамках данной работы мы представляем современную характеристику белкового состава хроматина человека. Она основана на интеграции данных о локализации и функциях белков хроматина из различных источников и дополнена анализом их физико-химических свойств и доменной архитектуры. Для поддержки дальнейших исследований в этой области мы разработали интерактивный веб-ресурс SimChrom (<https://simchrom.intbio.org/>), который содержит результаты анализа источников информации о белках хроматина, предложенную упрощенную классификацию этих белков, а также списки референсных белков ядра и хроматина. Работа поддержана в рамках научной темы Министерства науки и высшего образования Российской Федерации “Полногеномный эпигенетический анализ как основа разработки генетических технологий профилактики и терапии ковида” (FFRW-2023-0007), регистрационный номер 123120500032-9. Исследование выполнено за счет грантов Российского научного фонда #25-14-00046 (<https://rscf.ru/en/project/25-14-00046/>), #23-74-10012 (<https://rscf.ru/en/project/23-74-10012/>). А.К.Г. поддержана фондом Геннадия Комиссарова.

## **Б9. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАНДИДАТНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ТЕРАПИИ БОТУЛИЗМА**

Деркаев А. А.<sup>1</sup>, Рябова Е.И.<sup>1</sup>, Носков А.Н.<sup>1</sup>, Есмагамбетов И.Б.<sup>1</sup>, Щебляков Д.В.<sup>1</sup>

*1. Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России*

*\*derkaev.a@yandex.ru.*

**Ключевые слова:** однодоменные антитела, ботулизм, доклинические исследования

Одним из ключевых этапов разработки терапевтических препаратов на основе рекомбинантных антител является подтверждение их эффективности и безопасности. Ранее [1, 2] мы получили кандидатный препарат на основе модифицированных однодоменных антител B11-Fc, обладающий протективностью в отношении ботулинического токсина типа А (BoNT/A). Целью данной работы являлась оценка эффективности и безопасности антител B11-Fc в доклинических исследованиях.

В рамках доклинических исследований эффективности было проведено моделирование интоксикации BoNT/A на мышах внутрибрюшинным (в/б) и внутривентральным (в/ж) путями; эффективные дозы составили 5-10 LD<sub>50</sub> и 12000 LD<sub>50</sub> для в/б и в/ж введения соответственно. Внутримышечное (в/м) введение антител B11-Fc в дозе 0,6 мг/кг мышам обеспечивало 100% протективность при одновременном в/б введении BoNT/A в дозе 20 LD<sub>50</sub>. Продемонстрирована защитная эффективность препарата в профилактическом режиме применения – в течение 21 сут при в/б введении 5 LD<sub>50</sub> BoNT/A. В терапевтическом режиме применения антитело обеспечивало 100% защиту при его введении спустя 14 ч после в/ж введения 12000 LD<sub>50</sub> BoNT/A.

В рамках доклинических исследований безопасности были рассчитаны фармакокинетические параметры для рабочей дозы 0,6 мг/кг на мышах: максимальная концентрация  $C_{\max} = 1,22$  мкг/мл; время достижения максимальной концентрации  $T_{\max} = 1,0$  ч; площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время»  $AUC_{0-t} = 784,55$  мкг/мл×ч; период полувыведения  $T_{1/2}$  — 46,4 ч. Исследования острой токсичности на мышах и крысах продемонстрировали отсутствие значимого токсического действия на организм животных, а также местного раздражающего действия. Изучение хронической токсичности на кроликах и крысах показало колебание отдельных биохимических параметров, увеличение процента лимфоцитов и моноцитов в нескольких группах, изменение значений активированного частичного тромбопластинового времени, однако отклонения не носили дозозависимый характер, что говорит об отсутствии влияния препарата. При исследовании алергизирующих свойств реакция на введение исследуемого препарата B11-Fc отсутствовала. При исследовании иммунотоксичности было показано снижение общего процента лимфоцитов, повышение гранулоцитов, а также повышение моноцитов, эозинофилов, базофилов в костном мозге. Исследуемый препарат не влиял на гуморальный иммунный ответ на Т-зависимый антиген. Остальные исследуемые показатели находились в границах нормы, что свидетельствует об отсутствии выраженных иммунотоксических свойств.

Таким образом можно заключить, что препарат обладает эффективностью в режимах терапии, экстренной профилактики и краткосрочной профилактики в течение 21 суток после введения антител B11-Fc. Наблюдавшиеся незначительные изменения показателей при исследовании хронической токсичности, не имевшие четкой дозовой зависимости, могут рассматриваться как адаптационные реакции организма. Особого внимания заслуживает выявленная дозозависимая модуляция клеточного состава

иммунных органов, которая не сопровождалась нарушением функциональной активности иммунной системы. Это позволяет предположить, что изменения носят компенсаторный характер и не представляют непосредственной опасности. Полученные данные служат основанием для перехода к этапу изучения безопасности в рамках клинических исследований.

#### Список литературы

1. Camelid VHHs fused to human Fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin A in mice / S.A. Godakova, [и др.] // *Toxins (Basel)*. 2019. №11(8). С.464.
2. Кандидатный препарат на основе модифицированных однодоменных антител для терапии ботулизма, вызванного ботулиническим токсином типа А / А.А. Деркаев [и др.] // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025. №25(1). С. 58–70.

# **A10. ВЛИЯНИЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИХ СВОЙСТВ ИССЛЕДУЕМОЙ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ В БУФЕРНОЙ СИСТЕМЕ НА МОДЕЛИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ**

Дорошенко А. С.<sup>1\*</sup>, Лифанов Д. А.<sup>1</sup>, Слизов П.А.<sup>2</sup>

1. ВМедА им. С.М. Кирова РФ, Санкт-Петербург, Россия

2. "Российский центр неврологии и нейронаук", Москва, Россия

\**anytador2004@mail.ru*.

**Ключевые слова:** регенеративная медицина, биосовместимые материалы

Регенеративная медицина использует гидрогели как матриксы, способные воспроизводить ключевые свойства внеклеточного матрикса и создавать микроокружение, способствующее восстановлению тканей. Альгинат натрия (1,5%) обладает биосовместимостью и удобством формирования *in situ*, но ограничен низкой клеточной адгезией [1]. Добавление 5% свиного желатина повышает биологическую активность системы [2], сохраняя её механическую стабильность и интеграцию. Такая композиция стимулирует ангиогенез, заживление и иммунную регуляцию, что делает актуальной её доклиническую оценку *in vivo*.

В связи с этим актуальной задачей является доклиническая оценка свойств нового композитного гидрогеля.

Материалы и методы. Животные: самцы крыс линии Wistar, n=12 в каждой группе. Препараты: гель на основе 1,5% раствора альгината натрия в физиологическом буфере без/с добавлением 5% свиного желатина. Официальная мазь «Левомеколь» (контроль). Модель травмы: полнослойная рана диаметром 25 мм, нанесённая циркулярным ножом. Нанесение экспериментальных гидрогелей проводили ежедневно в течение 20 и 27 дней на раневую поверхность.

Динамику заживления оценивали с помощью кривых Каплана-Мейера, сравнивая медианное время достижения 25%, 50% и 75% эпителизации. Статистическую значимость определяли log-rank test.

Для морфологического описания использовали гистологические срезы в области рубцовой ткани, окрашенные гематоксилином и эозином.

Результаты. В контрольной группе заживление проходило равномерно, и к 22-25 суткам большинство ран достигали площади  $\leq 10$  мм<sup>2</sup>. Оба опытных геля показали неоднородный эффект. Часть ран заживала быстрее контроля ( $\leq 2$  мм<sup>2</sup> к 22 суткам), другая часть — медленнее (20-70 мм<sup>2</sup>), что привело к высокой вариабельности данных. Хотя при стандартном критерии заживления ( $\leq 10$  мм<sup>2</sup>) статистически значимых различий с контролем выявлено не было ( $p = 0,0679$  - для геля на основе 1,5% альгината натрия в физиологическом буфере;  $p = 0,544$  - с применением геля на основе 1,5% альгината натрия в физиологическом буфере с добавлением 5% свиного желатина), наблюдалась тенденция к ускоренному заживлению в отдельных подгруппах.

В контрольной группе на срезах папиллярные сосочки отсутствуют, однако эпидермис формирует глубокие, узкие складки; слой кератиноцитов представлен 3-4 рядами клеток, отмечено истончение эпидермиса.

На срезах с использованием экспериментального геля на основе альгината натрия в буферной системе отмечено выравнивание рельефа эпидермиса, сглаживание дерматоглифики, вероятно из-за роста тургора подлежащих тканей, в подлежащей соединительной ткани рубца формируется большое количество тангенциальных сосудов, которые в контрольной группе отсутствуют. Наблюдается рост толщины эпидермиса. Ядра кератиноцитов увеличиваются в размерах, становятся округлыми, что указывает на рост метаболизма. Кератиноциты формируют более 6 слоев клеток.

Гель с добавлением 5% свиного желатина. Морфологическая картина идентичная контрольной группе.

Таким образом, композитный гель действует как базовый раневой покров, но без дополнительных биоактивных компонентов (например, факторов роста) его эффект неоднороден [3]. Добавление желатина улучшает матриксную поддержку, однако из-за индивидуальных тканевых ответов результаты могут варьироваться, что требует дальнейших исследований.

#### Список литературы

1. Cao J. Research Progress of Sodium Alginate-Based Hydrogels in Biomedical Engineering / J. Cao, B. Wu, P. Yuan, Y. Liu, C. Hu // *Gels*. — 2025. — Vol. 11, № 9. — P. 758.
2. Salahuddin B. Hybrid Gelatin Hydrogels in Nanomedicine Applications / B. Salahuddin, S. Wang, D. Sangian, S. Aziz, Q. Gu // *ACS Applied Bio Materials*. — 2021. — Vol. 4, № 4. — P. 2886-2906.
3. López-Martínez S. Bioengineered endometrial hydrogels with growth factors promote tissue regeneration and restore fertility in murine models / S. López-Martínez, A. Rodríguez-Eguren, L. de Miguel-Gómez, E. Francés-Herrero, A. Faus, A. Díaz, A. Pellicer, H. Ferrero, I. Cervelló // *Acta Biomaterialia*. — 2021. — Vol. 135. — P. 113-125.

## **Б10. ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННОЙ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ VITIS VINIFERA L. СО СТАБИЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА MBAOJIN**

Дубовой С.А.<sup>1\*</sup>, Евтеева М.А.<sup>1</sup>, Кузьминкова А.А.<sup>1</sup>.

*1. НИЦ «Курчатовский институт»*

*\*sdubovou@gmail.com*

**Ключевые слова:** агробактериальная трансформация, биоинженерия, генетические технологии

Генетическое редактирование растений – перспективный инструмент в современной агrobiотехнологии, позволяющий получить новые генотипы с заданными свойствами в кратчайшие сроки. Флуоресцентные белки нередко используются как маркеры для быстрого подтверждения успешности трансформации или интеграции генетического материала в геном. Трансгенные растения, стабильно экспрессирующие флуоресцентные белки, используются для определения эффективности работы компонентов систем редактирования генома. Традиционно для этих целей используют такие флуоресцентные белки как GFP, RFP. Однако белок mBaоJin отличается большей фотостабильностью, лучше работает в условиях с низким рН, обладает более быстрой матурацией. Целью данного исследования было получение трансгенной каллусной культуры Vitis Vinifera L., стабильно экспрессирующей mBaоJin в качестве модельного объекта для дальнейшей оценки эффективности геномного редактирования с использованием различных систем CRISPR-Cas. В плазмидный бинарный вектор pKSE401 рестриктазно-лигазным методом была клонирована последовательность кодирующая mBaоJin под транскрипционным контролем конститутивного промотора CaMV 35S. Из единичной колонии агробактерий штамма GV3101 были получены электрокомпетентные клетки, которые в дальнейшем подверглись трансформации полученной плазмидой. Для агробактериальной трансформации каллус кокультивировали с штаммом GV3101. Стабильная и яркая флуоресценция проявилась через 3 дня после кокультивации. Это может свидетельствовать о более быстрой матурации и устойчивости белка в среде с пониженным рН в клетке. Данный эксперимент доказывает, что маркерный ген GFP можно заменить на mBaоJin для более быстрого получения светового сигнала и более устойчивой флуоресценции.

### **Список литературы**

1. Zhang H. et al. Bright and stable monomeric green fluorescent protein derived from StayGold // Nat Methods. - 2024. - Vol. 21.- No 4. - P. 657-665.
2. Maletich G., Gavrilenko I., Pushin A. et al. Somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation in a number of grape cultivars // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). - 2025. - Vol. 160. - A. 73.

## Б11. ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ ДЛЯ МУЛЬТИМОДАЛЬНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК И НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

Егорова И.Е.<sup>1,2\*</sup>, Дресвянникова А.А.<sup>2</sup>, Петрова А.С.<sup>3</sup>, Сосновцева А.О.<sup>4</sup>, Габашвили А.Н.<sup>2</sup>

1. НИЯУ МИФИ, Москва, Россия;

2. ИОФ РАН, Москва, Россия;

3. МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

4. ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

\*[irishka.irinka.ira090304@yandex.ru](mailto:irishka.irinka.ira090304@yandex.ru)

**Ключевые слова:** биотехнология, инкапсулины, мультимодальная визуализация, направленная доставка.

Объединив подходы химической и генетической инженерии, были созданы генетические конструкции, несущие последовательности, кодирующие высокомолекулярные капсидоподобные белковые наноструктуры – нанокompартменты (инкапсулины). Упомянутые белки состоят из оболочки и грузового белка, находящегося внутри. Нами было показано, что стабильная экспрессия генов, кодирующих нанокompартменты, может быть достигнута в клетках млекопитающих; в оболочку инкапсулинов возможно заключение различных грузовых белков – как нативных, так и экзогенных. Одним из таких белков является фермент с феррооксидазной активностью, катализирующий реакцию окисления  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$  с образованием наночастиц, обладающих Т2 контрастными свойствами, что позволяет отслеживать клетки после введения в организм лабораторных животных методом МРТ, а также проводить оценку величины магнитного сигнала по нелинейному намагничиванию. Нами были получены линии мезенхимных стромальных клеток человека, содержащие помимо инкапсулинов флуоресцентные белки, что дало возможность производить мультимодальный мониторинг клеток. При введении в мозг крыс клетки сохраняли свою жизнеспособность, не вызвали иммунологического отторжения, при этом сигнал сохранялся в течение недель после имплантации. Кроме того, описанные генетические последовательности были дополнены генами, кодирующими биолюминесцентные репортеры (FLuc и NanoLuc). Полученные последовательности были стабильно встроены в клетки метастатической опухоли легкого (LLC). Наличие наночастиц в клетках дает возможность отслеживать их методом МРТ, а присутствие люциферазы позволяет проводить оптическую томографию. Таким образом, наличие двух комплементарных меток дает возможность получать данные как о локализации клеток, так и об их жизнеспособности. Другим грузовым белком является фотоактивируемый флуоресцентный белок mCherry, позволяющий использовать инкапсулины в качестве метки для микроскопии сверхвысокого разрешения. Также нами были разработаны две векторные системы доставки на основе инкапсулинов, химически модифицированных флуоресцентно меченым трансферрином человека. Было показано что наночастицы селективно связываются с трансферриновыми рецепторами на поверхностях клеток с последующей интернализацией рецептор-опосредованным эндоцитозом. Таким образом, эти уникальные структуры показали себя полезной альтернативой конвенциональным наноплатформам.



## **Б12. КРИО-ЭМ РЕКОНСТРУКЦИЯ КАПСИДА ГИГАНТСКОГО ФАГА $\phi$ K601 С РАЗРЕШЕНИЕМ 3,8 Å**

Егорочкин М. Г.<sup>1\*</sup>, Митров Г. Р.<sup>1</sup>, Моисеенко А. В.<sup>1</sup>, Гупта И.<sup>2</sup>, Каледхонкар С.<sup>2</sup>, Кондабагил К.<sup>2</sup>, Соколова О. С.<sup>1,3</sup>,

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

2. Кафедра Биологических Наук и Биотехнологии, Индийский Технологический Институт, Бомбей, Мумбаи, Индия

3. Биологический факультет, Университета МГУ-ППИ в Шеньжэне, Шеньжень, Китай

**Ключевые слова:** биотехнология, структурная биология, гигантский бактериофаг, криоэлектронная микроскопия

Гигантские фаги привлекают внимание благодаря уникальным свойствам и потенциалу в борьбе с бактериями устойчивыми к антибиотикам. Их крупные капсиды способны упаковывать геномы >200 кбп, что обеспечивает разнообразие инфекционных и метаболических механизмов, а также повышенную устойчивость к бактериальным системам защиты. На сегодняшний день подробно охарактеризованы лишь две структуры гигантских фагов.

В данной работе представлена реконструкция капсида гигантского фага  $\phi$ K601, инфицирующего *Pseudomonas aeruginosa* (штамм PAO1). Крио-ЭМ-данные были собраны на микроскопе TFS Titan Krios G4, которые данные обрабатывались в CryoSPARC.

Реконструкция капсида была выполнена по 11502 проекциям отдельных вирионов. При наложении икосаэдрической симметрии было достигнуто разрешение 7,0 Å. Для уточнения структуры были проведены уточнения с расширением симметрии, фокусированные на отдельных областях капсида: вершине (3.8 Å), центре грани (3.8 Å) и центре ребра (3.8 Å), рассчитанные по критерию FSC 0,143. Съёмка с высокой дозой электронов подтвердила наличие у  $\phi$ K601 белкового внутреннего тела, подобно  $\phi$ KZ.

Полученные реконструкции создают основу для построения атомных моделей всех структурных белков фага  $\phi$ K601, что будет способствовать более глубокому пониманию его биологии и взаимодействия с клетками-хозяевами.

## A11. *IN SITU* МЕТАГЕНОМИКА ДЛИННЫХ ЧТЕНИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА СООБЩЕСТВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ БЕЛОГО МОРЯ

Зайцев П.А.<sup>1\*</sup>, Родин В.А.<sup>2</sup>, Зайцева А.А.<sup>1</sup>, Васильченко С.В.<sup>1</sup>, Олейников П.Д.<sup>1</sup>, Пивоваров Е.М.<sup>1</sup>, Сидорова А.Е.<sup>1</sup>, Зверева М.Э.<sup>2</sup>, Лобакова Е.С.<sup>1</sup>

1. Биологический факультет, МГУ имени М.В.Ломоносова

2. Химический факультет, МГУ имени М.В.Ломоносова

\* [zaytsevp@ty.msu.ru](mailto:zaytsevp@ty.msu.ru)

**Ключевые слова:** цианобактерии, перистые мхи, симбиоз, метагеномика длинных чтений

В экосистемах высокоширотных регионов с низким уровнем продуктивности, средообразующая роль диазотрофных гетероцитных цианобактерий (ЦБ), как свободноживущих, так и симбиотических (эндо- и эпифитных) имеет большое значение. В ходе ранее проведенного нами исследования методом 16S рРНК метабаркодинга на платформе 2-го поколения (NGS) определено таксономическое разнообразие эпифитных ассоциативных ЦБ, населяющих поверхность мха *Hylocomium splendens*. Более точная идентификация ЦБ возможна с применением технологии 3-го поколения – секвенирования длинных последовательностей гена 16S рРНК (~1500 п.о.) на платформе Oxford Nanopore (ONT). Целью данной работы было провести полифазную оценку биоразнообразия и функционального потенциала ЦБ, формирующих микробные сообщества и ассоциации с эукариотическими организмами в экосистемах высоких широт.

Объектами исследования служили сообщества ЦБ, собранные в окрестностях ББС МГУ имени Н.А. Перцова в июле 2024 и 2025 гг. Были собраны сообщества как свободноживущих ЦБ – в виде флоккул и биопленок в скальных ваннах зоны сублиторали, так и ассоциативных, обрастающих побеги плеврокарповых мхов. Первичная оценка сообществ проводилась методами светлопольной и флуоресцентной микроскопии с цитохимическим окрашиванием. Выделенную средовую (от англ. environmental) ДНК секвенировали методом нанопорового секвенирования всего гена *16S pPHK* (локус V1-V9, ~1500 п.о.), локуса гена большой субъединицы фермента RuBisCO *rbcL* (~500 п.о.) и локуса гена одной из субъединиц нитрогеназного комплекса *nifH* (~300 п.о.). Таксономическая классификация чтений проводилась с помощью алгоритмов *kraken2* и *BLAST* с использованием пользовательских баз данных соответствующих маркерных локусов, составленных на основе NCBI GenBank.

За двухлетний период исследований в районе ББС удалось сформировать обширную коллекцию ЦБ, включая как свободноживущие формы, так и те, что обитают в ассоциации со мхами. Из природных образцов получены накопительные культуры ЦБ, причём большинство из них демонстрировало способность к азотфиксации, успешно развиваясь на минеральной безазотной среде BG-11<sub>0</sub>. Морфоструктурный анализ выявил наличие в образцах трихомов ЦБ с выраженной клеточной дифференцировкой. Примечательно, что свободноживущие формы проявляли высокую способность накапливать биогенные элементы, формируя внутриклеточные включения цианофичина и β-оксибутирата. Применение метагеномики длинных чтений позволило провести видовую идентификацию ЦБ по трём генетическим локусам. В исследованных сообществах были обнаружены представители порядка *Nostocales*, включая различные роды: *Nostoc* (*N. commune*, *N. edaphicum*, *N. sphaeroides*, *N. piscinale*), *Stigonema* (*S. elegans*, *S. panniforme*), *Tolypothrix*, *Calothrix*, *Rivularia*. В ассоциациях с плеврокарповыми мхами преобладали диазотрофные ЦБ рода *Nostoc*.

Использование метагеномики длинных чтений существенно расширило понимание таксономического разнообразия ЦБ в природных условиях, как в

свободноживущих сообществах, так и в ассоциациях со мхами. В экосистемах высоких широт, особенно на скалистой местности, доминируют diazotrophic ЦБ — важнейший источник связанного азота для эукариотических организмов.

Исследование выполнено при поддержке проекта НОШ МГУ 23-Ш04-45 и проекта РНФ 23-74-00037.

## **A12. НА ПУТИ ОТ 2D К 3D – НЕЙРОМОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА**

Зубова А.В.<sup>1\*</sup>, Шумилин Р.В.<sup>2</sup>, Копылова А.А.<sup>2</sup>, Симкин И.В.<sup>2</sup>, Капкаева М.Р.<sup>1</sup>, Волегова Д.Д.<sup>2</sup>, Крючков Н.П.<sup>2</sup>, Юрченко С.О.<sup>2</sup>, Салмина А.Б.<sup>1</sup>, Иллариошкин С.Н.<sup>1</sup>

1. Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский центр неврологии и нейронаук»

2. Российский национальный исследовательский университет «Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана»

\*zubova.a.v@neurology.ru

**Ключевые слова:** васкулярные агрегаты, нейросферы, органоиды

Морфологические признаки – это один из значимых отличительных показателей синтезируемых биоинженерных моделей [Kahveci et al., 2025].

**Цель работы:** выявить значимые морфологические показатели в самоорганизующихся 2D – моделях (васкулярных агрегатах и нейросферах) для последующего прогнозирования морфометрического анализа 3D – моделей (васкулярных и церебральных органоидов).

**Основная идея:** известно, что модели заболеваний на грызунах не воспроизводят идентичные патофизиологические механизмы как у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями [Kim S.H., 2023]. Поэтому на пути создания и поиска критериев оценки сложных 3D-клеточных моделей можно синтезировать 2D-модели и на них выявить параметры оценки основываясь на том, что 2D и 3D-модели содержат различные виды клеток, обладающих способностью к самоорганизации [Eichmüller O.L., 2022].

**Предложенный путь решения:** синтезировать васкулярные агрегаты и нейросферы, провести их морфометрический анализ по снимкам в светлом поле, выполненным с помощью автоматической системы визуализации клеточных культур в реальном времени JuLI Stage (NanoEntek, Южная Корея).

### **Результаты и обсуждение**

Был проведен анализ по 15 морфометрическим критериям, по результатам обсчета выделены параметры со значимыми отличиями, из них подверглись анализу 3 параметра (Feret, Circularity, Area) согласно анализу литературных источников. Среди васкулярных агрегатов линий здорового донора и болезни Паркинсона по всем параметрам Feret, Circularity, Area обнаружены значимые различия ( $p < 0,001$ ). Напротив, нейросферы имеют значимые различия только по параметру Circularity ( $p < 0,01$ ). Можно предположить, что морфометрический параметр Circularity может являться значимым отличительным параметром при стандартизации методик синтеза васкулярных агрегатов и нейросфер болезни Паркинсона. Возможно, при стандартизации методик васкулярных и церебральных органоидов этот же параметр будет также значимым и, возможно, корреляционнозависимым от иммуногистохимических и других маркеров органоидов.

### **Список литературы**

1. Kahveci B. et al. BrAIn: A comprehensive artificial intelligence-based morphology analysis system for brain organoids and neuroscience // preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2025.02.19.638973>.
2. Eichmüller O.L., Knoblich J.A. Human cerebral organoids - a new tool for clinical neurology research // Nat Rev Neurol. 2022. Vol. 18(11). P. 661-680. doi: 10.1038/s41582-022-00723-9.
3. Kim S.H., Chang M.Y. Application of Human Brain Organoids-Opportunities and Challenges in Modeling Human Brain Development and Neurodevelopmental Diseases // Int J Mol Sci. 2023. Vol. 24(15). P. 12528. doi: 10.3390/ijms241512528.

### **Б13. ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАРКЕРА ПОВРЕЖДЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ**

Иззи А.Р.<sup>1,2,3</sup>, Лукьянов Д. А.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Сколковский институт науки и технологии, Центр Молекулярной и Клеточной биологии, [antonizzi5@mail.ru](mailto:antonizzi5@mail.ru)

<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики

<sup>3</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского

<sup>4</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет

Антибиотики представляют собой природные соединения, ингибирующие рост микроорганизмов. Со времён открытия и начала массового применения пенициллина было выделено и описано большое количество различных противомикробных соединений. Во многом этому поспособствовало появление такого инструмента, как платформа Ваксмана, которая ознаменовала наступление Золотой Эры антибиотиков. Тем не менее, самовольный приём антибиотиков без рекомендаций врачей, а также их неконтролируемое применение в сельском хозяйстве и животноводстве привело к массовому возникновению бактериальных штаммов, которые обрели устойчивость к большому количеству противомикробных соединений. В связи с этим для того, чтобы не проиграть в данной «гонке вооружений», необходимо появление новых и эффективных препаратов, что может быть достигнуто постоянным применением и усовершенствованием систем скрининга антибиотиков; данные системы позволяют определить не только наличие противомикробной активности у соединения, но также установить механизм его действия.

В данной работе был проведён поиск генетического маркера, повышенный уровень экспрессии которого может свидетельствовать о воздействии соединения, мишенью которого является бактериальная РНК-полимераза. Для поиска маркеров был проведён анализ данных транскриптома [PRJNA889731], полученных после воздействия на штамм *E. coli* K12 антибиотиков рифампицина, новобиоцина и тетрациклина, мишенями которых соответственно являются РНК-полимераза, гираза и рибосомы; целью данного анализа являлся отбор тех генов, которые продемонстрируют повышение уровня экспрессии при обработке рифампицином по сравнению с обработками другими антибиотиками. Анализ дифференциальной экспрессии был проведён с использованием программы DESeq2 [<https://github.com/thelovelab/DESeq2>]; в результате было обнаружено несколько генов, которые характеризовались наиболее высоким положительным значением  $\log_2\text{foldchange}$  в случае обработки рифампицином, которое не пресекалось с оставшимися группами образцов. Далее была проведена валидация обнаруженных находок методом qPCR; культуры штамма *E. coli* K12 обрабатывались различными антибиотиками, включая рифампицин, после чего выделяли РНК и из неё получали кДНК. В результате эксперимента только ген спермидинсинтазы продемонстрировал специфическое увеличение уровня экспрессии при обработке рифампицином. Дополнительное подтверждение данной мишени было проведено с использованием гиперчувствительного штамма *E. coli*, несущего делецию в гене *lptD*; выбор данного штамма был обоснован необходимостью использования дополнительного антибиотика – фидаксомицина, мишенью которого также является бактериальная РНК-полимераза, а штамм *E. coli* K12 является к нему невосприимчивым.

Исследование выполнено за счёт гранта Соглашение № 24-74-00139, <https://rscf.ru/project/24-74-00139/>

### **А13. БИОИНЖЕНЕРИЯ ЛИЗОСОМ КЛЕТКИ: ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВЛИЯНИЯ МЕТФОРМИНА, РАПАМИЦИНА, ТОРИНА НА АКТИВНОСТЬ V-ATPase**

Ильинский Н.С.<sup>1\*</sup>, Добрынин Н.С.<sup>1</sup>, Алехин В.А.<sup>1</sup>, Павлов В.В.<sup>1</sup>, Бухалович С.М.<sup>1</sup>, Багаева Д.Ф.<sup>1</sup>, Назарова С.Ф.<sup>1</sup>, Нестеров С.В.<sup>1</sup>, Горделий В.И.<sup>2</sup>

1. Московский физико-технический институт, Московская область, Россия,

2. Институт структурной биологии Университета Гренобль-Альпы, Гренобль, Франция.

\*электронная почта: [ilinsky@phystech.edu](mailto:ilinsky@phystech.edu)

**Ключевые слова:** клеточное старение, лизосомы, V-ATPase, аутофагия, метформин, рапамицин, торин, оптогенетика, AMPK, mTORC1, биоинженерия лизосом клетки.

Перспективными геропротекторами являются метформин, рапамицин и торин, продемонстрировавшие способность продлевать продолжительность жизни у модельных организмов и проходящие клинические испытания на людях. Их действие опосредовано активацией аутофагии и метаболической перестройкой клетки. Однако эффективность аутофагии в значительной степени зависит от функционального состояния лизосом, активность которых снижается с возрастом.

В настоящей работе мы провели биоинженерию лизосом клетки для динамического мониторинга лизосомного pH и активности V-ATPase, ключевого протонного насоса, обеспечивающего кислую среду внутри лизосом. Светоуправляемый белок был встроен в мембрану лизосом для неинвазивного временного их подщелачивания и оценки в реальном времени скорости их подкисления после выключения освещения. Наши данные выявили двуфазный ответ клеток на метформин. В течение первых 24 часов наблюдается ингибирование V-ATPase, что проявляется в замедленной скорости восстановления кислого pH после оптогенетического подщелачивания. На более поздних этапах (48-72 ч) происходит активация AMPK, сопровождающаяся восстановлением и даже усилением активности V-ATPase и стимуляцией аутофагии. Полученные результаты подчеркивают центральную роль лизосом не только как конечного звена аутофагии, но и как регуляторного узла метаболической перестройки, инициируемой геропротекторами. Оптогенетическая платформа открывает новые возможности для высокоточного функционального анализа лизосом в контексте старения и разработки терапевтических стратегий.

Работа выполнена за счёт проекта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение # 075-03-2024-117, проект FSMG-2024-0012).

#### **Список литературы**

1. Anisimov V. N. et al. If started early in life, metformin treatment increases life span and postpones tumors in female SHR mice //Aging (Albany NY). – 2011. – Т. 3. – №. 2. – С. 148.
2. Campisi J. et al. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing //Nature. – 2019. – Т. 571. – №. 7764. – С. 183-192.
3. Ma T. et al. Low-dose metformin targets the lysosomal AMPK pathway through PEN2 //Nature. – 2022. – Т. 603. – №. 7899. – С. 159-165.

#### **Б14. ИССЛЕДОВАНИЕ СЕНОЛИТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА DR5-СЕЛЕКТИВНОГО ВАРИАНТА TRAIL В КЛЕТКАХ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ХИМИО-ИНДУЦИРОВАННОЙ СЕНЕСЦЕНТНОСТЬЮ**

Исакова А. А.<sup>1,2\*</sup>, Антипова Н. В.<sup>2,3</sup>, Мазур Д. В.<sup>2</sup>, Иванова Е. И.<sup>1,2</sup>, Долгих Д. А.<sup>1,2</sup>, Кирпичников М. П.<sup>1,2</sup>, Гаспарян М. Э.<sup>2</sup>, Яголович А. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

<sup>3</sup> Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Россия  
\*alina.labbio@gmail.com

**Ключевые слова:** рак поджелудочной железы; сенесцентность; TRAIL; DR5-B

Аденокарцинома поджелудочной железы – один из наиболее агрессивных видов рака. Основу терапии составляют стандартные химиопрепараты, в частности гемцитабин. Химиопрепараты могут вызывать в опухолевых клетках остановку клеточного цикла и развитие сенесцентного фенотипа. Накопление таких клеток ограничивает пролиферацию опухоли, но сопровождается секрецией провоспалительных факторов, ассоциированных с сенесцентностью, вызывая малигнизацию клеток микроокружения опухоли и метастазирование. Это делает актуальным поиск препаратов для сенолитической терапии. В данной работе исследованы сенолитические свойства мутантного варианта противоопухолевого цитокина TRAIL – DR5-B, селективного к рецептору DR5, на клеточных линиях рака поджелудочной железы человека после инкубации с гемцитабином или доксорубицином. В клеточных линиях MIA PaCa-2 и PANC-1 оба препарата вызывали повышение активности  $\beta$ -галактозидазы и экспрессии ингибиторов клеточного цикла p21 и p27, при этом DR5-B эффективно подавлял их жизнеспособность. В линии VxPC-3 препараты не вызывали признаков сенесцентности, при этом чувствительность к DR5-B практически не изменялась. В линии AsPC-1 отмечались отдельные признаки сенесцентности, но эти клетки оставались резистентными к DR5-B, по-видимому, из-за гиперэкспрессии cFLIP. Таким образом, белок DR5-B имеет перспективы использования в качестве сенолитического препарата для терапии некоторых типов аденокарциномы поджелудочной железы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 24-24-00222.

## Б15. АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ В ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА НА ФОНЕ НОКАУТА КОГЕЗИНА

Казаков Е.П.<sup>1,2\*</sup>, Коваленко А.Р.<sup>1,2</sup>, Сынтин-Бураковский Д.В.<sup>1,2</sup>, Киреев И.И.<sup>1,2</sup>

1. НИИ Физико-Химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова

2. Кафедра клеточной биологии и гистологии, Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова

\* email: kazakov.evgeny.2016@post.bio.msu.ru

**Ключевые слова:** хроматин, когезин, субдифракционная микроскопия

Когезин, как основной архитектурный белок хроматина играет важную роль в организации и регуляции функций генома [1]. Он обеспечивает формирование петлевых доменов хроматина в интерфазе и удержание сестринских хроматид в митозе до момента их расхождения в анафазе. Образование петель хроматина играет ключевую роль в формировании топологически-ассоциированных доменов и в обеспечении взаимодействий энхансеров с промоторами для активации транскрипции. Когезин также обеспечивает правильное расхождение сестринских хроматид в митозе. Несмотря на то, что сегрегация генома наблюдается только в анафазе, ещё в интерфазе происходит их ранняя индивидуализация сестринских хроматид [2]. Укладка удвоенной в ходе репликации ДНК представляет большой интерес для исследований, так как удвоение ДНК не приводит к значительному утолщению хроматиновых фибрилл [3]. Целью нашего исследования является анализ пострепликативной реорганизации хроматина при дисфункции когезина.

В нашем исследовании мы использовали клеточную линию HCT116 с ауксиновым дегроном Rad21 для моделирования нокаута когезина. Для анализа изменений в организации хроматиновых доменов мы проводили репликативное мечение и последующую количественную оценку методами субдифракционной микроскопии (SIM или STORM), а также с помощью электронной микроскопии. Мы проводили измерение различных параметров, характеризующих распределение репликативной метки в ядре, при помощи ПО CellProfiler с последующим машинным обучением для классификации ядер по паттернам репликации и кластеризации между контрольными клетками и клетками с нокаутом когезина.

Наши предварительные результаты демонстрируют, что нокаут Rad21 субъединицы когезинового комплекса приводит к декомпактизации репликативных доменов. С течением времени после репликативного мечения происходит перераспределение репликативного сигнала вдоль хроматиновых фибрилл, что свидетельствует о перестройке хроматиновых доменов без значительного утолщения фибрилл.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Некоммерческого Фонда развития науки и образования «Интеллект».

### Список литературы

1. Hoencamp C., Rowland B. D. Genome control by SMC complexes //Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2023. – Т. 24. – №. 9. – С. 633-650.
2. Batty P. et al. Cohesin-mediated DNA loop extrusion resolves sister chromatids in G2 phase //The EMBO journal. – 2023. – Т. 42. – №. 16. – С. e113475.
3. Deng X. et al. Cytology of DNA replication reveals dynamic plasticity of large-scale chromatin fibers //Current Biology. – 2016. – Т. 26. – №. 18. – С. 2527-2534.



#### **А14. РЕГЕНЕРАЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ШЕЛКА**

Казакова К.А. \*, Рамонова А.А., Мойсенович А.М.

Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова

Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова

\*krkan7@mail.ru

**Ключевые слова:** фиброин, аксон, нейроны, нейрорегенерация

Современные методы терапии повреждений периферических нервов зачастую не обеспечивают полноценного восстановления их функциональной активности, что обуславливает необходимость поиска и разработки инновационных подходов к стимуляции регенеративных процессов в нервной ткани. Одним из перспективных направлений является создание нервных кондуитов – биоинженерных аналогов внеклеточного матрикса, предназначенных для направленной аксональной регенерации в дистальном направлении от места повреждения. Фиброин, структурный белок шелка *Bombyx mori*, демонстрирует значительный потенциал в качестве материала для разработки кондуитов, благодаря его биосовместимости, низкой иммуногенности и пригодности для формирования матриксов методом электроспиннинга [1].

Целью данного исследования являлась разработка и *in vitro* оценка для потенциального применения в регенерации периферических нервов биоинженерных конструкций на основе фиброина с инкорпорированным в состав фактором роста BDNF.

В рамках данного исследования фиброиновые кондуиты были получены методом электроспиннинга с использованием двух различных типов коллекторов, что позволило варьировать морфологические характеристики формируемых конструкций. Для оценки возможности применения полученных образцов в качестве носителей для адресной доставки биологически активных веществ в зону регенерации, в состав исходной реакционной смеси был предварительно включен фактор роста BDNF. Использование различных технологий электроспиннинга позволило получить наноструктурированные образцы с различной ориентацией волокон, что было подтверждено методом сканирующей электронной микроскопии: были получены образцы как с однонаправленными, так и с разнонаправленными волокнами. Исследование биodeградации показало, что полученные конструкции стабильны в нейтральной, окислительной и ферментативной средах в течение месяца, что обеспечит достаточный период для регенерации нервной ткани. Анализ кинетики высвобождения BDNF с использованием иммуноферментного анализа показал равномерное высвобождение фактора роста из подложек в течение 4 дней, это даёт возможность оказывать пролонгированное воздействие на регенерирующие клетки в области повреждения. Для оценки био- и нейросовместимости полученных образцов, а также влияния морфологии подложек на рост и ориентацию нейритов, проводилось культивирование терминально дифференцированных клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. Результаты показали, что образцы поддерживают адгезию и рост нейроноподобных клеток, а однонаправленная морфология волокон способствует сонаправленному росту нейритов, что является важным фактором для направленной регенерации нервных волокон.

Таким образом, разработанные биоинженерные конструкции на основе фиброина шелка, содержащие BDNF, поддерживают рост нейритов и формирование нейроноподобного волокна *in vitro*, что свидетельствует о перспективности их использования в качестве биоинженерных конструкций для направленной регенерации периферических нервов.

#### Список литературы

1. Nosenko M.A., Moysenovich A.M., Arkhipova A.Y. Fibroblasts upregulate expression of adhesion molecules and promote lymphocyte retention in 3D fibroin/gelatin scaffolds // Bioactive Materials. 2021. Vol. 10. P. 3449-3460.

## **Б16. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ И САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ВЫЯВИЛИ ОБЩИЙ САЙТ СВЯЗЫВАНИЯ ИНГИБИТОРА И АКТИВАТОРА КАНАЛА TRPV3**

Калиновский А.П.<sup>1,\*</sup>, Андреев Я.А.<sup>1</sup>

*1. Государственный научный центр РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10*

*\*kalinovskii.ap@gmail.com*

**Ключевые слова:** TRPV3, 14-дезоксидеидегидроандрографолид, каннабидиол, ваниллоидный сайт

Термо- и хемочувствительный катионный канал TRPV3 вовлечен в поддержание гомеостаза кожного покрова и волосяных фолликул. В условиях разрушения кожного барьера и воспаления наблюдается гиперактивация TRPV3 на фоне высоких концентраций провоспалительных медиаторов, а также повышенная презентация канала на мембране. Врожденные мутации, усиливающие функцию TRPV3, вызывают развитие синдрома Олмстеда, признаками которого являются патологии кожи, зуд и алопеция. Поиск и разработка ингибиторов TRPV3 представляет собой новую стратегию борьбы с заболеваниями кожи и волосяного покрова, в которых TRPV3 играет ключевую роль. Установление молекулярного механизма действия разрабатываемых соединений является необходимой стадией, предопределяющей успех доклинических испытаний.

Ранее мы выделили новый ингибитор TRPV3, природный дитерпеноид 14-дезоксидеидегидроандрографолид (ДДА), который проявил высокую активность в мышинных моделях зуда, вызванных агонистом TRPV3 карвакролом и гистамином. В ходе настоящего исследования был установлен сайт связывания ДДА с TRPV3. С помощью метода Шильда было установлено, что ДДА конкурентно ингибирует активацию канала каннабидиолом с высокой эффективностью ( $IC_{50}$  11 нМ). С применением молекулярного докинга, получены модели связывания каннабидиола и ДДА с TRPV3 в ваниллоидном кармане трансмембранного домена канала. Согласно полученным моделям, взаимодействие изучаемых лигандов с каналом опирается на гидрофобные взаимодействия. С помощью сайт-направленного мутагенеза в предполагаемом сайте были найдены аминокислотные замены, существенно влияющие на связывание каннабидиола и ДДА. Замена L664A облегчала активацию канала каннабидиолом, а замена L557A полностью отменяла ингибирующее действие ДДА. Таким образом, был установлен общий сайт связывания каннабидиола и ДДА с TRPV3, что открывает возможности для рационального дизайна активных молекул с заданными свойствами.

## Б17. РАЗНООБРАЗИЕ ВОЗМОЖНЫХ СТРАТЕГИЙ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ СБОРКИ ФРАГМЕНТОВ ДНК ИЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ НА МИКРОЧИПАХ

Катичева А. Э.<sup>1,2\*</sup>, Семашко Т.А.<sup>1</sup>

1. Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины  
Роспотребнадзора

2. Московский физико-технический институт (национальный исследовательский  
университет)

\*katicheva.ae@phystech.edu

**Ключевые слова:** синтетическая биология, синтез генов *in vitro*, искусственная клетка

Высокопроизводительный синтез ДНК *in vitro* имеет большое фундаментальное и прикладное значение в синтетической биологии. Использование олигонуклеотидов, синтезированных на микрочипах, позволяет значительно снизить стоимость синтеза протяженных последовательностей ДНК. Целью данной работы является разработка новых методов сборки фрагментов ДНК из олигонуклеотидов, синтезированных на микрочипах.

В качестве целевого фрагмента для синтеза был выбран участок генома *Mycoplasma gallisepticum* длиной в 87 тыс. п. о. Генерация олигонуклеотидов для сборки была выполнена в программе BAC-browser [1]. Смесь из 2178 олигонуклеотидов, синтезированных на микрочипе и имеющих служебные последовательности, при помощи селективной ПЦР-амплификации была разделена на пулы олигонуклеотидов, необходимых для сборки единичных фрагментов ДНК длиной 1 тыс. п. о.

В первом наборе вариантов возможных методов сборки из амплифицированных пулов были получены одноцепочечные олигонуклеотиды. На них был опробован ряд стратегий сборки фрагментов ДНК: лигазная цепная реакция, двухстадийная ПЦР-сборка и одностадийная ПЦР-сборка. Используя одностадийную ПЦР-сборку, удалось получить фрагмент длиной в 1 тыс. п. о.

Во втором наборе вариантов из пулов были получены двухцепочечные олигонуклеотиды. Был опробован спектр методов: одностадийная ПЦР-сборка, двухстадийная ПЦР-сборка, трехстадийная ПЦР-сборка с дополнительным этапом амплификации, двухэтапная и одноэтапная сборки по Гибсону. Используя каждый из этих методов, удалось получить набор фрагментов длиной по 1 тыс. п. о.

Результаты данного исследования демонстрируют разнообразие возможных стратегий высокопроизводительной сборки фрагментов ДНК из олигонуклеотидов, синтезированных на микрочипах.

Работа проводилась при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-08043) и Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (грант 122030900107-3).

### Список литературы

1. Semashko, T.A. et al. BAC-browser: the tool for synthetic biology // BMC Bioinformatics. 2025. Vol. 26, № 1. P. 27.

## **Б18. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ И СЕКРЕЦИИ ИНСУЛИНА**

Клычкова О.О.<sup>1\*</sup>, Ли А.А.<sup>1</sup>, Хотина В.А.<sup>1</sup>, Каширских Д.А.<sup>1</sup>, Гасанов В.А.<sup>1</sup>

*1. ФГБУН Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Центр коллективного пользования «Группа геномных технологий»*

*\*olesya\_k8@mail.ru; o.o.klychkova@idbras.ru*

**Ключевые слова:** генная инженерия, биотехнология, клеточные технологии

Настоящее исследование посвящено решению одной из наиболее актуальных проблем современной медицины — поиску эффективных методов лечения сахарного диабета 1 типа. Существующие терапевтические подходы, такие как трансплантация поджелудочной железы или бета-клеток островков Лангерганса, обладают существенными ограничениями, связанными с дефицитом донорского материала и повторным иммуноопосредованным разрушением бета-клеток. Для решения данных ограничений можно рассмотреть разработку альтернативной терапии на основе использования непанкреатических клеток. В связи с этим, целью данной работы являлось получение генно-модифицированных непанкреатических клеток человека, экспрессирующих и секретирующих инсулин.

Основной задачей исследования стала разработка и экспериментальная проверка плазмидных конструкций, кодирующих различные комбинации последовательностей генов проинсулина и ключевых протеолитических ферментов, необходимых для его посттрансляционного процессинга [1]. Данный подход может позволяет моделировать естественный процессинг созревания инсулина в непанкреатических клетках. Гены объединяли в единую транскрипционную конструкцию под контролем цитомегаловирусного промотора, при этом кодирующие последовательности были разделены последовательностью самовырезающегося пептида Т2А. В качестве селективного маркера использовался mCherry. Сборку рекомбинантных конструкций осуществляли стандартными методами молекулярного клонирования и верифицировали путем рестрикционного анализа. Для проверки функциональности плазмидных конструкций в качестве моделей были использованы такие клетки, как НЕК293Т и мезенхимальные стромальные клетки (МСК). Транфекцию плазмидами проводили с использованием липофектаминового реагента. Количественное содержание инсулина в генетически-модифицированных клетках определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Эффективность трансфекции клеток НЕК293Т и МСК разработанными плазмидами не превысила 5%. Несмотря на это, результаты ИФА показали статистически значимое повышение уровня инсулина в модифицированных клетках линии НЕК293Т, а именно увеличение внутриклеточной концентрации в 6 раз, а внеклеточной — в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой ( $p$ -value < 0,05). Хроматографический анализ выявил сходную тенденцию: внеклеточная концентрация инсулина увеличилась в 25 раз в модифицированных клетках линии НЕК293Т и в 10 раз — в модифицированных МСК, тогда как внутриклеточная концентрация инсулина увеличилась в 1,4 раза в МСК по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности создания генно-модифицированных непанкреатических клеток, экспрессирующих и секретирующих инсулин, при совместной экспрессии генов проинсулина и ферментов его процессинга. В рамках дальнейших исследований планируется определение наиболее подходящего типа непанкреатических клеток для использования в качестве клеточной платформы для экспрессии инсулина.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 0088-2025-0005).

1. Hutton, J. C. Insulin secretory granule biogenesis and the proinsulin-processing endopeptidases / J. C. Hutton // *Diabetologia*. 1994. Vol. 37– P. 48–56.

## Б19. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ *Neurod* И ИХ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Коврига Ю.М.<sup>1\*</sup>, Гавриш М.С.<sup>1,2</sup>, Тутукова С.А.<sup>1</sup>, Тарабыкин В.С.<sup>2</sup>

1. Научно-исследовательский институт Нейронаук, университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23/7;

2. Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технический университет «Сириус», 354340, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Олимпийский проспект, д.1.

\*yulia.kovriga@gmail.com

**Ключевые слова:** *in situ* гибридизация, нейрогенез, транскрипционные факторы

Формирование коры головного мозга представляет собой высокоорганизованный процесс, состоящий из множества этапов, каждый из которых контролируется транскрипционными факторами, обеспечивающими точную пространственно-временную экспрессию генов.

Особое значение в регуляции нейрогенеза играют транскрипционные факторы семейства *Neurod*, экспрессия которых наблюдается с самых ранних этапов эмбрионального развития. Различные патологические процессы, приводящие к нарушению работы этих факторов, способствуют формированию врожденных пороков развития головного мозга, однако причастные молекулярно-клеточные механизмы остаются недостаточно изученными. Понимание фундаментальных процессов, лежащих в основе формирования коры головного мозга, может способствовать разработке новых методов пренатальной и преимплантационной диагностики, а также потенциальных стратегий терапевтической коррекции врожденных аномалий развития.

Цель работы – выявить потенциальные гены-мишени транскрипционных факторов семейства *Neurod* с помощью метода *in situ* гибридизации.

С помощью глубокого секвенирования коры головного мозга, полученной от мышей с нокаутом ключевых представителей *Neurod* (*Neurod1*, *Neurod2* и *Neurod6*), были идентифицированы потенциальные гены-мишени, чья экспрессия была в значительной степени снижена по сравнению с тканями головного мозга, полученными от мышей контрольной группы (без нокаута).

Использованный в нашем исследовании метод *in situ* гибридизации позволяет идентифицировать и локализовать области экспрессии искомым генов-мишеней в фронтальных срезах головного мозга мышей линии C57bl/6, а также мышей с тройным нокаутом *Neurod1/2/6* ТКО. Нами было установлено значительное снижение уровня экспрессии *Tiam2* и практически полное отсутствие его мРНК в коре головного мозга, полученной от *Neurod1/2/6* ТКО. В научной литературе *Tiam2* охарактеризован как важная молекула, способная регулировать развитие нервной системы через молекулярный каскад *Tiam2-Rac1*. Другой интересный ген, экспрессия которого сильно снижена у мышей *Neurod1/2/6* ТКО, – *Sez6*. Исследования на мышях с дефицитом *Sez6* показали, что он необходим для нормального формирования дендритного дерева пирамидных нейронов в развивающейся коре.

Выявление генов-мишеней транскрипционных факторов *Neurod* и изучение молекулярных каскадов, находящихся под их контролем, позволит понять фундаментальные процессы, определяющие развитие коры больших полушарий.

Работа выполнена при финансовой поддержке министерства науки и высшего образования РФ (грант № FSWR-2023-0029).

## **В20. РЕГИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА МИКРОГЛИИ ПРИ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА IN VIVO**

Гарифуллина А.А., Тимофеева А.В., Коковихина С.А.\*, Галлямов Д.Р.<sup>1</sup>, Ахметзянова Э.Р.<sup>1</sup>

*1. ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет"*

*\*kokovixina05@bk.ru*

**Ключевые слова:** травма спинного мозга, фенотип, микроглия, крысы.

Травма спинного мозга (ТСМ) представляет собой тяжёлое повреждение центральной нервной системы, сопровождающееся развитием продолжительного нейровоспалительного процесса, который приводит к утрате двигательных и сенсорных функций. В патогенезе ключевую роль играют клетки микроглии — основные фагоцитирующие элементы ЦНС, способные продуцировать как провоспалительные, так и противовоспалительные цитокины. Несмотря на значительное количество проведённых исследований, региональные особенности активации микроглии при ТСМ остаются недостаточно изученными, а существующие терапевтические подходы сохраняют ограниченную эффективность. В связи с этим целью данной работы является проведение количественной оценки уровней белков TGF- $\beta$  и IL-10, а также анализ относительной экспрессии мРНК генов Iba1, TGF- $\beta$  и CD209 в области, прилежащей к эпицентру травмы (Th10), и в зоне поясничного утолщения (L2–L3).

В данном эксперименте крысам породы Wistar (n=5) была проведена контузионная ТСМ тяжелой степени (4 м/с) на уровне Th8 с использованием Leica Impact One Stereotaxic. На 60 сутки после повреждения проводился забор сегментов Th10 и L2-L3 для проведения дальнейшего анализа. Количественную оценку Iba1<sup>+</sup>-клеток и Iba1<sup>+</sup>/TGF $\beta$ <sup>+</sup>-клеток проводили методом иммуофлуоресцентного (ИФ) анализа на криостатных срезах, а оценку концентрации цитокина IL-10 мультиплексным иммуноанализом. В ходе ИФ анализа в зоне передних рогов (VH) было показано, что число Iba1<sup>+</sup>-клеток и TGF- $\beta$ +/Iba1<sup>+</sup>-клеток увеличивалось в области Th10 в группе ТСМ 4м/с при сравнении с аналогичным показателем в сегментах L2-L3 исследуемой группы. Количество Iba1<sup>+</sup>-клеток было выше в области, приближенной к эпицентру повреждения при сравнении с зоной, расположенной каудальнее от ТСМ. В результате мультиплексного иммуноанализа в группе ТСМ 4 м/с достоверных различий не было выявлено. Относительную экспрессию мРНК генов Iba1, TGF $\beta$  и CD209 рассчитывали относительно GAPDH. В области Th10 отмечен более высокий уровень экспрессии CD209 и TGF- $\beta$  в группе с ТСМ по сравнению с L2-L3, однако уровень экспрессии гена Iba1 оставался стабильно высоким в обоих исследуемых сегментах.

Полученные данные свидетельствуют о выраженной региональной гетерогенности активации микроглии после тяжелой контузионной травмы спинного мозга. В зоне Th10 отмечено повышение количества Iba1<sup>+</sup>- и Iba1<sup>+</sup>/TGF- $\beta$ <sup>+</sup>-клеток, а также увеличение экспрессии генов TGF- $\beta$  и CD209 по сравнению с сегментом L2–L3. Эти результаты указывают на сохранение активированного фенотипа микроглии в хроническую фазу ТСМ и предполагают наличие локальных механизмов регуляции противовоспалительного ответа вблизи очага повреждения. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, программа «Приоритет 2030».



## А15. ПОРИСТЫЕ БИОПОЛИМЕРНЫЕ КАРКАСЫ ИЗ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА

Комаров А. А.\* , Дудаев А.Е., Кесслер Е.И.

Сибирский федеральный университет

\* komarovart911@gmail.com

**Ключевые слова:** биоинженерия, биополимерные каркасы, реконструктивный остеогенез

**Аннотация.** В работе представлено исследование по разработке пористых биополимерных каркасов, пригодных для тканевой инженерии костной ткани, из биоразлагаемых поли-3-гидроксibuтирата (ПЗГБ) и его сополимера поли-3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалетрата (ПЗГБ/ЗГВ) методом литья из раствора и выщелачивания. Исследованы влияние размера частиц и типа порообразователя (NaCl,  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) на физико-химические и биологические свойства. Показано, что каркасы из ПЗГБ и  $C_{12}H_{22}O_{11}$  в качестве порообразователя демонстрируют большую влагопоглощающую способность, а из ПЗГБ/ЗГВ и NaCl увеличивают гидрофильность поверхности. Анализ снимков адгезированных и пролиферирующих на каркасах клеток, полученных флуоресцентной микроскопией, показал, что оптимальный рост и развитие первичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека поддерживают каркасы из порообразователей фракции 80–100 мкм и основного полимера – ПЗГБ.

Результаты.

Таблица 1. Варианты полученных каркасов

№	Образец	Порообразователь
1	ПЗГБ/ЗГВ	NaCl 80–100
2	ПЗГБ	NaCl 80–100
3	ПЗГБ + ПЗГБ/ЗГВ (50:50)	NaCl 80–100
4	ПЗГБ/ЗГВ	NaCl 40–63
5	ПЗГБ	NaCl 40–63
6	ПЗГБ + ПЗГБ/ЗГВ (50:50)	NaCl 40–63
7	ПЗГБ/ЗГВ	$C_{12}H_{22}O_{11}$ 80–100
8	ПЗГБ	$C_{12}H_{22}O_{11}$ 80–100
9	ПЗГБ + ПЗГБ/ЗГВ (50:50)	$C_{12}H_{22}O_{11}$ 80–100
10	ПЗГБ/ЗГВ	$C_{12}H_{22}O_{11}$ 40–63
11	ПЗГБ	$C_{12}H_{22}O_{11}$ 40–63
12	ПЗГБ + ПЗГБ/ЗГВ (50:50)	$C_{12}H_{22}O_{11}$ 40–63

### Обсуждение

1. Каркасы, изготовленные из ПЗГБ, демонстрируют наибольшую способность к влагопоглощению, равную  $6,96 \pm 1,5\%$  (спустя 1 час) и  $65,3 \pm 9,6\%$  (спустя 1 неделю).
2. Каркасы из ПЗГБ/ЗГВ продемонстрировали меньшие значения влагопоглощения:  $6,27 \pm 3,3\%$  (1 час) и  $28,5 \pm 9,8\%$  (1 неделя).
3. Смешанные из ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ каркасы продемонстрировали усредненный показатель влагопоглощения в  $35 \pm 20\%$ .
4. Наиболее гидрофильными были образцы, полученные методом выщелачивания с помощью NaCl в качестве порообразователя и ПЗГБ/ЗГВ в качестве основы каркаса.

5. Лучшую адгезию и пролиферацию МСК демонстрируют каркасы, изготовленные с применением порообразователей фракции 80–100 мкм.
6. Наибольшее количество клеток наблюдается на образцах из ПЗГБ.
7. Было подтверждено благоприятное влияние показателя краевого угла смачивания в пределах 60–75° и высокого уровня влагопоглощения на адгезию и пролиферацию клеток.

**Заключение.** Перспективными каркасами для остеогенеза являются каркасы, созданные из ПЗГБ с использованием порообразователя фракции 80–100 мкм. Гидрофильность поверхности до 75° обуславливает лучший показатель адгезии и культивирования клеток. Использование сахарозы в качестве порообразователя повышает влагопоглощающую способность, что имеет важный момент для поддержания активной пролиферации.

## **Б21. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИЗОФОРМ КАНОНИЧЕСКИХ ГИСТОНОВ НА СТАБИЛЬНОСТЬ НУКЛЕОСОМ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ**

Косарим Н.А.<sup>1,2\*</sup>, Шайтан А.К.<sup>1,2</sup>

1. МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия

2. Институт биологии гена, 119334 Москва, Россия

\*n.kosarim@intbio.org.

**Ключевые слова:** нуклеосомы, изоформы канонических гистонов, белок-белковые взаимодействия, молекулярная динамика

Гистоны – ключевые белки, принимающие участие в упаковке эукариотической ДНК – обычно представлены в клетке каноническими и вариантными формами. Канонические гистоны в свою очередь делятся на изоформы, которые различаются, главным образом, несколькими аминокислотными заменами и долгое время считались функционально идентичными. В настоящее время известно, что различные изоформы канонических гистонов обладают специфическими функциями и ассоциированы с клеточной пролиферацией и онкогенезом [1-3]. Предполагается, что это связано с характерными аминокислотными заменами изоформ, влияющими на стабильность нуклеосом [4,5]. Однако атомистические детали подобного влияния остаются малоизученными. Таким образом, целью данной работы было определение механизмов регуляции стабильности нуклеосом различными изоформами канонических гистонов на атомистическом уровне.

Для выявления аминокислотных замен, влияющих на стабильность нуклеосом, мы провели расчет энергии связывания гистонов в моделях октамеров, содержащих все изоформы канонических гистонов человека. Среди всех изученных замен H2A A40S продемонстрировала наиболее значительный эффект, приводя к ослаблению как внутримерных, так и междимерных взаимодействий. В противоположность этому, замена H2B G75S вызывает небольшое, но заметное увеличение аффинности внутри димера. В результате сравнительного молекулярно-динамического моделирования нуклеосом, содержащих данные замены, и нуклеосом дикого типа было обнаружено, что замена H2A A40S дестабилизирует нуклеосому, что способствует более интенсивному разворачиванию нуклеосомной ДНК. Это объясняется локальной реорганизацией внутринуклеосомных контактов, приводящей к ослаблению связывания H2B с ДНК. В свою очередь, замена H2B G75S способствует укреплению контактов соседнего H2B E71 с H4 K91 – сайтом нескольких посттрансляционных модификаций, участвующих в регуляции структуры хроматина [6,7].

Наши данные раскрывают новый атомистический механизм, обуславливающий функциональную роль изоформ, несущих замену H2A A40S, в регуляции стабильности нуклеосом. Замена H2A A40S дестабилизирует нуклеосомы, влияя на межгистоновые контакты и ослабляя взаимодействия H2B с ДНК. Также мы предполагаем, что замена H2B G75S может опосредованно влиять на организацию хроматина, выступая в роли регулятора посттрансляционных модификаций H4 K91.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-64-00001-П.

### **Список литературы**

1. Singh R. et al. Replication-dependent histone isoforms: a new source of complexity in chromatin structure and function // *Nucleic acids research*. – 2018. – Т. 46. – №. 17. – С. 8665-8678.
2. Shah S. et al. Histone H2A isoforms: Potential implications in epigenome plasticity and diseases in eukaryotes // *J. Biosci.* – 2020. – Т. 45. – №. 4. – С. 10.1007.

3. Dhahri H. et al. Beyond the usual suspects: examining the role of understudied histone variants in breast cancer // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – T. 25. – №. 12. – C. 6788.
4. Tanaka H. et al. Biochemical and structural analyses of the nucleosome containing human histone H2A. J // The Journal of Biochemistry. – 2020. – T. 167. – №. 4. – C. 419-427.
5. Bhattacharya S. et al. Histone isoform H2A1H promotes attainment of distinct physiological states by altering chromatin dynamics // Epigenetics & Chromatin. – 2017. – T. 10. – №. 1. – C. 48.
6. Ye J. et al. Histone H4 lysine 91 acetylation: A core domain modification associated with chromatin assembly // Molecular cell. – 2005. – T. 18. – №. 1. – C. 123-130.
7. Bao X. et al. Glutarylation of histone H4 lysine 91 regulates chromatin dynamics // Molecular cell. – 2019. – T. 76. – №. 4. – C. 660-675. e9.

## **Б22. PARP1 КАК РЕГУЛЯТОР ДОСТУПНОСТИ НУКЛЕОСОМНОЙ ДНК ДЛЯ CRISPR/DCAS-КОМПЛЕКСОВ**

Кошкина Д.О.\*<sup>1,2</sup>, Мариловцева Е.В.<sup>3</sup>, Назарова А.С.<sup>1</sup>, Малюченко Н.В.<sup>1</sup>, Феофанов А.В.<sup>1,2</sup>

*1 Биологический факультет, МГУ им.М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия*

*2 Институт биологии гена РАН, 119334, г. Москва, Россия*

*3 Научный центр психического здоровья, 115522, Москва, Россия*

*\* koshkina.daria.2015@post.bio.msu.ru*

**Ключевые слова:** PARP1; dCas; нуклеосома; spFRET

Хотя PARP1 традиционно считается сенсором разрывов ДНК, в последнее время растёт число свидетельств о его способности реорганизовывать хроматин [1]. Интактная нуклеосома в составе хроматина содержит плотно компактизованную нуклеосомную ДНК, экранированную взаимодействиями с гистоновым октамером. В таком состоянии нуклеосома является барьером на пути различных белков и белковых комплексов. Ключевую роль в преодолении этого барьера играют пионерные факторы транскрипции. Учитывая эти данные, мы предположили, что PARP1 функционирует как пионерный фактор. В данной работе влияние PARP1 на структуру нуклеосомы в области коровой ДНК исследовали методами spFRET и EMSA. Для оценки способности PARP1 функционировать в качестве пионерного фактора мы использовали систему на основе dCas12a с sgRNA, комплементарной участку в коровой области нуклеосомы, который в интактном состоянии недоступен для связывания с другими белками.

Нуклеосомы получали методом ступенчатого диализа с использованием канонического рекомбинантного гистонового октамера и флуоресцентно меченой ДНК. Флуоресцентные метки были введены в позиции ДНК, таким образом, чтобы после сборки нуклеосомы, они оказывались в непосредственной близости друг от друга. Благодаря такому расположению меток возможно отслеживать расстояние между соответствующими участками ДНК, что позволяет изучать изменения в структуре нуклеосом при различных условиях или добавлении белков [2]. Комбинируя методы spFRET и EMSA, мы обнаружили, что связывание PARP1 с нуклеосомой вызывает структурные изменения в организации её коровой ДНК, в результате чего стерические ограничения, накладываемые гистоновым октамером на нуклеосомную ДНК, частично устраняются, что позволяет dCas12a взаимодействовать с нуклеосомной ДНК.

Таким образом, показано, что PARP1 может выступать в роли пионерного фактора, облегчая доступ к геномной информации и повышает эффективность геномного редактирования.

Финансирование: Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение No 075-15-2024-539).

Список литературы:

1. Koshkina D., Maluchenko N., Nilov D., Lyubitelev A., Korovina A., Pushkarev S., Armeev G., Kirpichnikov M., Studitsky V., Feofanov A. Non-Classical H1-like PARP1 Binding to Chromatosome. *Cells*. 2025;14(17):1309.
2. Maluchenko N., Koshkina D., Korovina A., Studitsky V., Feofanov A. Interactions of PARP1 Inhibitors with PARP1-Nucleosome Complexes. *Cells*. 2022;11(21):3343.

## Б23. АВТОМАТИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРИЗАЦИИ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННО МОДИФИЦИРОВАННЫХ АМИНОКИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГРАФОВОЙ НЕЙРОСЕТИ ESPALOMA CHARGE

Кристовский Н.В.<sup>1\*</sup>, Армеев Г.А.<sup>1</sup>, Антюфриева Л.А.<sup>2</sup>

1. *Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова*

2. *Сколковский институт науки и технологий*

\**krist179@mail.ru*

**Ключевые слова:** молекулярная динамика, параметризация, GAFF, GNN

Метод молекулярной динамики (МД) позволяет моделировать движение молекул и отдельных атомов в их составе. Этот метод широко применяется для изучения структурных и динамических свойств биомолекул — белков, нуклеиновых кислот, липидов и других биологически значимых соединений. Белки представляют собой полимеры из стандартных аминокислот, параметры которых описаны в силовых полях (AMBER, CHARMM), применяемых при расчёте траекторий биомолекул. Однако в природе структура аминокислотных остатков может изменяться вследствие посттрансляционных модификаций (ПТМ). Такие модификации существенно влияют на активность и функциональные свойства белков. В существующих полноатомных силовых полях параметризованы только стандартные аминокислоты, тогда как их посттрансляционные модификации, как правило, не описаны. Для изучения влияния ПТМ на динамику белков необходимо разработать протокол параметризации, позволяющий проводить моделирование систем, содержащих аминокислоты с посттрансляционными модификациями.

В настоящее время процесс параметризации молекул для силового поля GAFF остаётся трудоёмким и недостаточно автоматизированным. Одним из наиболее ресурсоёмких этапов параметризации является расчёт парциальных зарядов атомов, требующий значительных временных и вычислительных затрат. Для решения этой задачи в разработанном протоколе используется графовая нейронная сеть Espaloma Charge. Нейронная сеть обучена на наборе данных SPICE (Small-Molecule/Protein Interaction Chemical Energies), включающем около 110 тысяч химических соединений — от дипептидов и стандартных аминокислот до их модификаций из базы PubChem.

Целью данной работы является разработка и оптимизация протокола параметризации нестандартных аминокислот для силового поля GAFF с использованием нейросетевых методов.

Исследование выполнено при поддержке Некоммерческого Фонда развития науки и образования "Интеллект

## **Б24. ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ СТРЕССА ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ПОДПИТКОЙ АПОПТОЗ-РЕЗИСТЕНТНЫХ КЛЕТОК CHO**

Крюков Ф.А.<sup>1\*</sup>, Шайфутдинов Р.Р.<sup>1</sup>, Орлова Н.А.<sup>1</sup>

*1. ФИЦ Биотехнологии РАН*

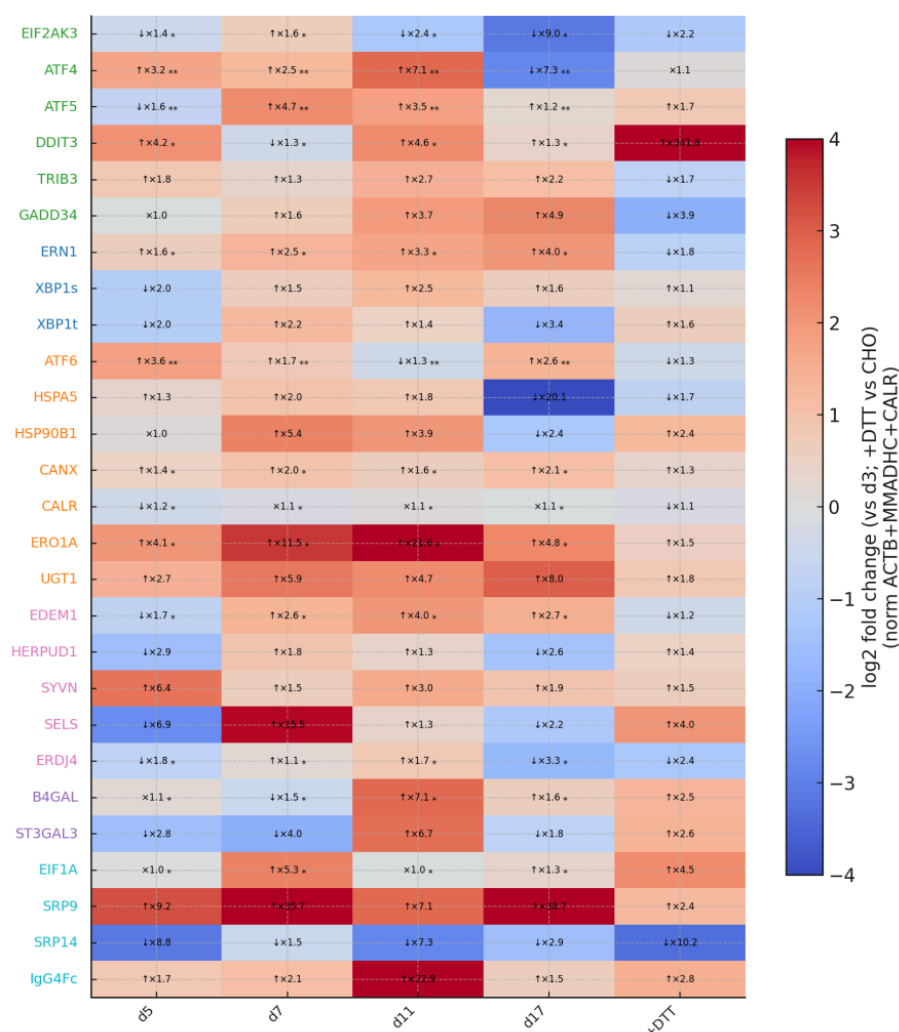
*\*feodorkru05@gmail.com*

**Ключевые слова:** стресс ЭПР, клетки яичника китайского хомячка, ответ на несвернутый белок

Целью работы являлось изучение экспрессии генов при развитии стресса эндоплазматического ретикулума (ЭР) при длительном культивировании апоптоз-резистентных клеток китайского хомячка (CHO), секретирующих рекомбинантный белок. Описание развития ЭР-стресса позволит улучшить режим культивирования продуцентов, а в дальнейшем оптимизировать их геном.

Исследовали клетки-продуценты GLP1-Fc на основе апоптоз-резистентной линии CHO 4BGD [1], культивировавшиеся 21 день с подпиткой в среде EmCD CHO 101. Методом ОТ-РВ-ПЦР анализировали экспрессию генов, ассоциированных с ветвями UPR (PERK, IRE1, ATF6), шаперонами, компонентами ERAD, синтезом белка и гликозилированием. В качестве положительного контроля использовали клетки с прямой индукцией ЭР- стресса дитиореитолом (DTT).

У продуцентов наблюдалась активация различных ветвей UPR. К 7-11 дню выявлялось статистически значимое повышение уровня транскрипции PERK и его эффектора ATF4 (в 3.2 и 2.8 раза соответственно), и последующая активация гена DDIT3/CHOP (в 4.5 раза к 9 дням). Ветвь IRE1-XBP1 оставалась слабоактивной, что может быть связано с отсутствием у клеток 4BGD BAX/BAK1, нарушающем формирование олигомеров IRE1, необходимых для сплайсинга XBP1. Экспрессия шаперона BiP возрастала в первые дни культивирования (пик к 5 дням), затем снижалась, что может свидетельствовать об исчерпании ресурса адаптации. Выявлено значительное снижение экспрессии гена SRP14. Индукция генов ERAD (HERPUD1, SYVN1) свидетельствует об активации механизмов деградации неправильно свернутых белков. Интересно, что, несмотря на активацию про-апоптотического фактора CHOP, клетки CHO 4BGD сохраняли жизнеспособность.



**Рисунок 1. Тепловая карта изменений экспрессии генов в процессе длительного культивирования клеток-продуцентов и при DTT-индуцированном стрессе ЭР.** Показаны логарифмические изменения экспрессии ( $\log_2FC$ ) 27 генов относительно контроля (день 3 для культивирования, CHO без обработки DTT для +DTT). Статистическая значимость по методу Бенжамини-Хохберга (BH-FDR): \* $q < 0.05$ , \*\* $q < 0.01$ . Цветами выделены названия генов различных функциональных групп: зеленый - регуляция стресса ЭР ветвь PERK; синий – ветвь IRE1/XBP1; оранжевый - шапероны и ATF6; розовый – путь ERAD; фиолетовый - гликозилирование; бирюзовый - синтез белка. Данные нормализованы по генам ACTB ( $\beta$ -актин), MMADHC (метилмалонил-КоА-мутаза) и CALR (кальретикулин).

Таким образом, при культивировании апоптоз-резистентных клеток CHO развивается ЭР-стресс с доминированием PERK-ATF4-DDIT3 пути и постепенным истощением адаптационного потенциала. Полученные результаты важны для разработки стратегий инженерии клеточных линий, направленных на реинжиниринг секреторного пути.

#### Список литературы

1. Orlova N.A. et al. Genomic and Phenotypic Characterization of CHO 4BGD Cells with Quad Knockout and Overexpression of Two Housekeeping Genes That Allow for Metabolic Selection and Extended Fed-Batch Culturing // Cells. 2025. Vol. 14, No. 10. P. 692



## **Б25. СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРЕХ ТИПОВ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ДОСТАВКИ НУКЛЕАЗ CAS9 И CAS12A ПО НОКАУТУ МОДЕЛЬНЫХ ЛОКУСОВ, КОДИРУЮЩИХ КОРЕЦЕПТОРЫ ВИЧ**

Ксенофонтова А.В.<sup>1\*</sup>, Круглова Н.А.<sup>1</sup>

*1. Института биологии гена РАН, ул. Вавилова, д. 34/5, Москва, Российская Федерация, 119334*

*\* nastyaksen2003@gmail.com, +79653069391*

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas, вирусоподобные частицы, ВИЧ

Применение технологии генетического редактирования CRISPR/Cas в клинической практике ограничено трудностями, связанными с разработкой безопасного и эффективного способа доставки в клетки. Одним из перспективных методов является доставка CRISPR/Cas в форме рибонуклеопротеинового (РНП) комплекса гидовой РНК (гРНК) и нуклеазы в составе вирусоподобных частиц (VLP). Среди разнообразных систем VLP высокую эффективность показали разработанные разными научными группами частицы Cas-VLP, eVLP и NanoMEDIC.

В литературе прямое сравнение этих конструкций не описано и нет данных о сравнении различных нуклеаз в их составе. Поэтому для дальнейшего изучения и развития технологий доставки CRISPR/Cas в клетки мы провели оценку эффективности генетического редактирования с помощью трех типов VLP с нуклеазами SpCas9 и AsCas12a на модельных локусах – CXCR4 и CCR5, являющихся потенциальными мишенями для генотерапии ВИЧ. Кроме этого, нуклеаза AsCas12a, в отличие от SpCas9, обладает РНКазной активностью и способна процессировать транскрипты, поэтому для нее возможно применение конструкций для экспрессии гРНК в клетках-продуцентах под контролем промотора РНК полимеразы II, например промотора CMV. Ранее в нашей лаборатории на частицах NanoMEDIC уже было показано, что использование конструкций, содержащих один или несколько одинаковых спейсеров под контролем CMV промотора, позволяет существенно повысить уровень редактирования по сравнению с конструкциями с U6 промотором [1]. Такие результаты, предположительно, связаны с направленным выходом CMV транскриптов из ядра и увеличением количества гРНК в цитоплазме, что приводит к более эффективному формированию РНП-комплексов и их упаковке в частицы, происходящей в цитоплазме под плазматической мембраной. В связи с этим, для всех трех типов VLP с AsCas12a были протестированы три конструкции для экспрессии гРНК: под контролем U6 промотора (далее U6-гРНК), CMV промотора с одним спейсером (CMV-гРНК) и шестью спейсерами (CMV-гРНК(6R5) для CCR5 и CMV-гРНК(6X4) для CXCR4).

При сравнении трех типов VLP с нуклеазами SpCas9 и AsCas12a по эффективности редактирования на трансгенном локусе CCR5 было показано, что все три типа VLP с AsCas12a вызвали более высокий уровень нокаута, чем соответствующие VLP с SpCas9, а использование CMV-гРНК в VLP с AsCas12a позволило повысить уровень редактирования с помощью всех трех типов VLP примерно до 90%. Для эндогенного локуса CXCR4 VLP с SpCas9 и AsCas12a и U6-гРНК оказались неэффективны и не привели к нокауту. Осуществить редактирование позволила замена промотора U6 на CMV для экспрессии гРНК в случае VLP с AsCas12a. Дополнительно повысить уровень редактирования на 20-30% удалось, используя CMV-гРНК(6X4).

Полученные результаты указывают на то, что три системы VLP обладают сопоставимой активностью. На эффективность редактирования в большей степени влияет выбор нуклеазы и конструкции для экспрессии гРНК. Наибольшую активность показали VLP с AsCas12a и гРНК, экспрессируемой под контролем CMV промотора.

#### Список литературы

1. Borovikova S.E., Shepelev M.V., Mazurov D.V., Kruglova N.A. Efficient Genome Editing Using 'NanoMEDIC' AsCas12a-VLPs Produced with Pol II-Transcribed crRNA // International journal of molecular sciences. - 2024. - №25(23)

## **Б26. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ В ЯДРАХ *DROSOPHILA* АРХИТЕКТУРНЫХ БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИХ ДОМЕНЫ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ C2H2-ТИПА**

Кудряшова К.С.,<sup>1</sup> Саллум Г.<sup>1</sup>, Максименко О.Г.<sup>1</sup>, Георгиев П.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт биологии гена РАН, Москва*

**Ключевые слова:** ядро, хроматин, транскрипционные факторы, C2H2 белки

Регуляция пространственной организации хроматина в ядре является одним из ключевых механизмов контроля экспрессии генов. Важную роль в этом процессе играют архитектурные белки, способные сближать удалённые участки генома. Однако механизмы, регулирующие их доступность и распределение в нуклеоплазме, остаются малоизученными.

В данной работе для решения этой фундаментальной задачи были применены методы геной и белковой инженерии. Нами были получены трансгенные линии *Drosophila melanogaster*, экспрессирующие архитектурные белки, содержащих домены цинковых пальцев C2H2-типа, dCTCF, Pita и M1BP, слитые с флуоресцентными белками (eGFP, mCherry) или эпитопом FLAG. Это позволило провести систематическое исследование пространственного распределения этих белков в живых эмбрионах на ранних стадиях развития.

С помощью конфокальной микроскопии было установлено, что все три белка формируют в ядре специфические белковые кластеры (тельца), начиная с интерфазы 14-го клеточного цикла. Данные тельца сохраняются на протяжении всей интерфазы и диссоциируют при разрушении ядерной оболочки.

Для изучения функциональной роли доменов белка Pita в образовании кластеров был использован подход сайт-направленного мутагенеза. Мы показали, что N-концевой ZAD-домен, ответственный за димеризацию, критически важен для формирования ядерных телец, в то время как сайт связывания с инсуляторным белком CP190 не оказывает на этот процесс существенного влияния.

Для проверки гипотезы о том, что выявленные тельца служат резервуаром для белков, не связанных с хроматином, было проведено их картирование относительно основных эпигенетических меток. Методами иммунофлуоресценции с использованием антител к специфическим модификациям гистонов (H3K9me, H3K27me2/3, H3K9ac) было установлено положение ядерных телец архитектурных белков относительно зон активного (эухроматин) и репрессированного (гетерохроматин) хроматина. Полученные данные свидетельствуют, что как минимум тельца Pita распределены в ядерном пространстве независимо от типа окружающего хроматина, что подтверждает нашу гипотезу о роли телец в качестве динамических хранилищ, обеспечивающих быструю доступность архитектурных белков для посадки на хроматин после репликации.

Таким образом, комбинация методов геной инженерии и современной микроскопии позволила выявить и охарактеризовать новый уровень организации ядерного пространства, что вносит значительный вклад в понимание принципов эпигенетической регуляции.

## БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГИСТОНА H2A.J

Куликов В. В.<sup>1\*</sup>, Л. Сингх-Пальчевская<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова*

[\\*kulikovvv@my.msu.ru](mailto:kulikovvv@my.msu.ru)

Ключевые слова: биоинформатика, хроматин, гистоны, биоинженерия

Гистоны играют ключевую роль в регуляции структуры хроматина и экспрессии генов [1]. Например, вариант H2A.J способствует разворачиванию ДНК и может снижать стабильность нуклеосомы [2]. К сожалению, гены H2A.J мало изучены и идентифицированы только для человека и мыши [2]. В данной работе проведен биоинформатический анализ гистона H2A.J для оценки его эволюционного происхождения и распространения среди различных видов живых организмов. С помощью алгоритма BLASTN в базе данных nr из NCBI были найдены последовательности, гомологичные человеческому гену, кодирующему H2A.J. Результаты анализа продемонстрировали, что данный вариант присутствует у всех отрядов плацентарных млекопитающих, и отсутствует у сумчатых и однопроходных. Сравнительный анализ синтении иллюстрирует консервативность локусов и прилегающих генетических регионов, что подтверждает ортологичность найденных генов H2A.J в различных отрядах плацентарных млекопитающих. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей показало наличие характерных для H2A.J замен в N- и C-концевых хвостах (A11V и мотив SQKTKSK) у плацентарных млекопитающих. При этом у сумчатых и однопроходных, несмотря на высокое сходство с каноническими гистонами H2A, данных замен не было обнаружено. Филогенетический анализ подтвердил обособленность найденных гистонов H2A.J от других вариантов H2A. Анализ разнообразия кодонов в ряде отрядов с качественной аннотацией геномов показал, что несинонимичные замены сконцентрированы в терминальных доменах гистона H2A.J, тогда как синонимичные замены распределены равномерно по всей длине гена, включая кодоны, кодирующие аминокислоты критичные для функциональных и структурных особенностей нуклеосомы. Кроме того, результаты теста МакДональда–Крейтмана предполагают действие стабилизирующего отбора в данных отрядах.

### Список литературы

1. Fedulova AS, Armeev GA, Romanova TA, Singh-Palchevskaia L, Kosarim NA, Motorin NA, et al. Molecular dynamics simulations of nucleosomes are coming of age // WIREs Comput Mol Sci. 2024; 14(4):e1728
2. Kosarim, N.A.; Fedulova, A.S.; Shariyafetdinova, A.S.; Armeev, G.A.; Shaytan, A.K. Molecular Dynamics Simulations of Nucleosomes Containing Histone Variant H2A.J // Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 12136.

# **A16. IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЯ КОМБИНИРОВАННЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ БОРТЕЗОМИБА И DR5-СЕЛЕКТИВНОГО TRAIL НА КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Куковьякина Е.В.<sup>1\*</sup>, Исакова А.А.<sup>2,3</sup>, Гаспарян М.Э.<sup>3</sup>, Кусков А.Н.<sup>1</sup>, Яголович А.В.<sup>2</sup>

1. РХТУ имени Д.И. Менделеева

2. Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

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

\**kukoviakina.e.v@mustr.ru*

**Ключевые слова:** бортезомиб, DR5-селективный TRAIL, аденокарцинома поджелудочной железы, амфифильный поли-N-винилпирролидон

Рак поджелудочной железы – заболевание с резистентностью к большинству традиционных методов лечения, включая химиотерапию, лучевую и молекулярно-таргетную терапию. Одним из перспективных подходов в терапии рака поджелудочной железы является разработка полимерных систем доставки нескольких противоопухолевых веществ одновременно, обладающих различными физико-химическими свойствами и зачастую проявляющих синергетический противоопухолевый эффект. Цель работы – *in vitro* исследование комбинированных систем доставки на основе амфифильного поли-N-винилпирролидона с загруженным внутрь низкомолекулярным гидрофобным протеасомным ингибитором бортезомибом и модифицированных гидрофильным рекомбинантным белком DR5-селективным TRAIL (DR5-B) (ПВП-БТЗ-DR5-B) или его бифункциональным вариантом с iRGD пептидом (DR5-B-iRGD) (ПВП-БТЗ-DR5-B-iRGD).

ПВП-БТЗ-DR5-B и ПВП-БТЗ-DR5-B-iRGD были получены модификацией поверхности наноразмерных частиц с бортезомибом (ПВП-БТЗ) в физиологическом растворе. Сорбционная ёмкость составила  $5,0 \pm 0,5$  мкг DR5-B/мг ПВП-БТЗ и  $4,5 \pm 0,5$  мкг DR5-B-iRGD/мг ПВП-БТЗ соответственно. ПВП-БТЗ-DR5-B и ПВП-БТЗ-DR5-B-iRGD быстрее интернализировали рецептор DR5 и значительно ингибировали рост клеточных линий аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1, BxPC-3 и MIA PaCa-2 в сравнении с ПВП-БТЗ и свободными DR5-B или DR5-B-iRGD. В полученных системах DR5-селективный TRAIL выступает не только как таргетный лиганд, избирательно связывающийся с рецептором смерти DR5, но и обладает собственной противоопухолевой активностью, а в комбинации с бортезомибом проявляет синергетический противоопухолевый эффект. Кроме того, DR5-селективный TRAIL, иммобилизованный на поверхность наноразмерных частиц, способствует лучшей кластеризации рецептора DR5 и, следовательно, у ПВП-БТЗ-DR5-B и ПВП-БТЗ-DR5-B-iRGD скорость интернализации рецептора DR5 выше, чем у свободных лигандов. Стоит отметить, что скорость интернализации рецептора DR5 и цитотоксический эффект ПВП-БТЗ-DR5-B-iRGD были существенно выше, чем у ПВП-БТЗ-DR5-B. Наличие iRGD пептида, с улучшенной проницаемостью в опухолевые ткани, усиливает эффективность комбинированной системы ПВП-БТЗ-DR5-B-iRGD.

ПВП-БТЗ-DR5-B и ПВП-БТЗ-DR5-B-iRGD вызывали гибель клеток по механизму апоптоза и при этом не проявляли выраженной цитотоксичности для здоровых клеток. Таким образом, разработанные системы доставки на основе амфифильного поли-N-винилпирролидона с бортезомибом и DR5-селективным TRAIL могут являться перспективной платформой для терапии аденокарциномы поджелудочной железы.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №23-15-00468.*

## Б27. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ АБС ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ

Ладнов Э.О., Шурыгин Б.М., Соловченко А.Е., Зайцев П.А.

МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет  
eduardladnov@gmail.com

**Ключевые слова:** сообщества, метагеномика, длинные чтения, профилирование, биоизъятие фосфора

Альго-бактериальные сообщества (АБС) – важный компонент биосферы, распространенный в большинстве водных экосистем, а также в почве и антропогенных экотопах. АБС – это симбиотические сообщества фототрофных микроорганизмов (цианобактерий и микроводорослей) в роли эдификаторов с гетеротрофными бактериями, археями, грибами и другими микроорганизмами. Исследования АБС имеют значение как для экологического мониторинга, так и для задач биоинженерии и биотехнологии, однако состав и функциональная роль АБС, а также физиологический статус их компонентов могут варьировать под взаимным влиянием и действием внешних факторов. Метагеномный анализ позволяет изучать таксономический состав и оценивать функциональный потенциал АБС *in situ*, однако метод осложняется отсутствием удобных инструментов для анализа сложных многокомпонентных АБС, а также ограниченностью геномных баз данных эукариотических микроорганизмов. Цель работы — создание алгоритма функционального профилирования АБС на основании результатов метагеномного секвенирования на платформах третьего поколения Oxford Nanopore Technologies (ONT).

Метагеномные чтения были получены секвенированием суммарной ДНК АБС из водоёмов в районе городов Апатиты и ББС имени Н.А. Перцова на платформе ONT. Сборка и бининг метагеномных данных выполнялись с помощью онлайн-сервиса BugSeq. Анализ проводился путём оценки степени соответствия микробиома определенным функциональным профилям – в данной работе на примере биоизъятия фосфора. Профили формировались – отдельно для эукариот и прокариот – из списка генов и их нуклеотидных последовательностей, кодирующих функции транспорта фосфата в клетки и биосинтеза полифосфатов, согласно литературным источникам базе данных метаболических путей и KEGG. Сопоставление эталонных профилей как с полученными метагеномными бинами, так и с сырыми длинными чтениями, проводили средствами алгоритма BLAST с последующим расчётом значения степени соответствия заданному функциональному профилю по формуле:

$$T = \sum_{j=1}^m \left( \frac{\sum_{i=1}^n b_i p_i}{n} \right)_j,$$

где  $T$  — значение степени соответствия микробиома заданному функциональному профилю,  $b$  — bit score (по выдаче BLAST),  $p$  — %identity (по выдаче BLAST),  $n$  — число совпадений у одного организма (бина),  $m$  — число организмов (бинов) в сообществе.

Представленность генов эукариотической составляющей АБС намного ниже представленности генов прокариот, что говорит о доминирующей роли прокариотической составляющей АБС в процессах биоизъятия и биоаккумуляции фосфатов. Вместе с тем, положительная корреляция представленностей генов фосфорного метаболизма между прокариотическим и эукариотическим компонентами АБС говорит о сильной взаимосвязи метаболических процессов эукариот и прокариот в АБС. По результатам анализа метагеномных бинов наибольшим потенциалом к

изъятию и накоплению фосфора среди АБС из водных биотопов, загрязненных фосфатами, обладало АБС из озера Большая Имандра, а по результатам анализа необработанных длинных чтений — АБС из прудов вблизи хвостохранилища АНОФ-2. Анализ состава хитов с учетом специфики конкретных генов свидетельствует, что высокий метаболический потенциал к поглощению и запасанию фосфора у АБС из бедных фосфором местообитаний отражает наличие в геномах микроорганизмов из этих АБС адаптационных механизмов АБС к перманентному дефициту биодоступного фосфора. Разработан алгоритм количественной оценки соответствия эталонным профилям метагеномов АБС, способный работать как с собранными метагеномами («бинами»), так и с необработанными метагеномными чтениями с платформы Oxford Nanopore. Дальнейшее развитие алгоритмов функционального профилирования АБС позволит автоматизировать и упростить процесс поиска решений задач биотехнологии.

## **A17. ПЛАЦЕНТА-НА-ЧИПЕ КАК ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ АНАЛИЗА ТРАНСПЛАЦЕНТАРНОГО ПЕРЕНОСА**

Лазарева О.А.<sup>1,3\*</sup>, Колесов Д.В.<sup>2,4</sup>, Кудрявцев Д.С.<sup>5,6</sup>, Вишнякова П.А.<sup>1,2</sup>

1. НИИ Молекулярной и клеточной медицины РУДН

2. НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ

3. НИУ ВШЭ

4. НИТУ «МИСиС»

5. ГНЦ ИБХ РАН

6. Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

\*ol9ala.lazareva@yandex.ru

**Ключевые слова:** плацента-на-чипе, микрофлюидика, никотин, плацентарный перенос

Моделирование фармакокинетики на органах-на-чипах – микрофлюидных моделях органов человека – позволило исключить этические трудности и ошибочные экстраполяции, связанные с работой на модельных животных. В связи со значительным дефицитом знаний о физиологии плацентарного барьера человека целью данного исследования стала разработка плаценты-на-чипе.

Уникальность предлагаемой нами модели плаценты заключается в числе и комбинации клеточных типов, входящих в её состав. Помимо линий трофобласта и эндотелия, наша плацента-на-чипе содержит макрофаги, заключенные в коллаген I типа, что отражает значительную роль иммунных клеток в нормальном функционировании плацентарного барьера. В исследовании использовались клеточные линии трофобласта, эндотелия и моноцитов человека. Для анализа трансплацентарного переноса никотин в физиологической концентрации вносили в культуральную среду со стороны «матери» и через 24 часа определяли концентрацию никотина в обеих лунках с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии.

В ходе исследования нами был разработан протокол полимеризации коллагена I типа с интегрированными в него макрофагами человека. Было показано, что внедренные макрофаги сохраняли жизнеспособность в геле в течение 48 часов. Выявлено, что 24-часовая инкубация клеток с форсколином вызывает слияние клеток трофобласта. Был получен коэффициент фармакокинетического распределения никотина между материнской кровью и плацентой, равный 0,54, на основании которого были построены фармакокинетические кривые никотина при трансплацентарном переносе в модели плаценты-на-чипе. Стоит отметить, что полученный нами коэффициент согласовывался с данными *in vivo* экспериментов [1].

Таким образом, разработанная нами клеточная модель плаценты-на-чипе может в дальнейшем быть использована в качестве тест-системы при создании лекарственных препаратов и проверки их безопасности для плода, а также для моделирования различных патологий беременности, влияющих на проницаемость плацентарного барьера.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-14-00382.

Список литературы:

1. Luck W. [и др.]. Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers // *Developmental pharmacology and therapeutics*. 1985. № 6 (8). С. 384–395.



## **Б28. НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ И РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ БЕЛКОВ PARP**

Лобанова А.А.<sup>1\*</sup>, Саулина А.А.<sup>1</sup>, Кошкина Д.О.<sup>1</sup>, Гераськина О.В.<sup>1</sup>, Коровина А.Н.<sup>1</sup>, Нилов Д.К.<sup>2</sup>, Феофанов А.В.<sup>1</sup>, Студитский В.М.<sup>1,3</sup>, Малюченко Н.В.<sup>1</sup>

*1. Кафедра биоинженерии, Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия*

*2. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия*

*3. Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, штат Филадельфия, США*

*\* angelina.lobanova@student.msu.ru.*

**Ключевые слова:** ингибиторы PARP, real-time визуализация, нуклеосомы

Онкологические заболевания являются острой проблемой современного человечества. Существуют различные подходы к лечению рака. Одно из перспективных направлений – воздействие на белковые мишени, отвечающие за репарацию ДНК в клетке. Белки PARP1 и PARP2 способны связывать разрывы ДНК и синтезировать из субстрата NAD<sup>+</sup> полимеры АДФ-рибозы, которая является маркером для привлечения к месту повреждения ДНК определенных белков системы репарации. PARPs можно рассматривать как подходящие мишени для воздействия противораковых препаратов. Особенно эффективно применение ингибиторов PARP при лечении BRCA-ассоциированных типов рака. Однако использование одобренных на данный момент клинических ингибиторов, таких как олапариб, нирапариб и рупариниб, приводит к множественным побочным эффектам, что снижает возможности их применения в терапии. Основные проблемы, которые можно выделить в данной сфере: токсичность клинических ингибиторов, сложность в изучении механизма ингибирования, а также отсутствие быстрых и точных методов проверки эффективности и механизма ингибирования. В своей работе мы поставили цель изучить производные азотистых оснований, как новые потенциальные нетоксичные ингибиторы PARP, а также – разработать новые, актуальные методы исследования ингибиторов PARP. По результатам экспериментов было выявлено, что соединения 7-метилгуанин и 8-гидрокси-7-метилгуанин проявляют различные механизмы воздействия на ДНК-связывающую активность белков PARP1 и PARP2, что соответствует первому и третьему типу ингибирования согласно классификации ингибиторов PARP (оценка производилась при сравнении с референсными клиническими ингибиторами). Воздействие клинических ингибиторов и производных азотистых оснований на ДНК-связывающую и каталитическую активность белков PARP1 и PARP2 изучали методами spFRET-микроскопии и вестерн-блоттинг, а также новыми методами, разработанными для данной цели: гель-электрофорез в нативных условиях, а также – real-time визуализация и оценка влияния ингибиторов на взаимодействие белков PARP с нуклеосомами, детектируемая конфокальным флуоресцентным микроскопом. Было показано, что новые методы доступны, легко реализуемы, и в перспективе их возможно масштабировать и использовать в технологических целях для тестирования ингибиторов PARP как потенциальных лекарственных средств.

Работа поддержана грантом междисциплинарных научно-образовательных школ Московского государственного университета (проект № 23-Ш04-57).

## Б29. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ВЕРИФИКАЦИЯ ДИНАМИКИ МАРКЕРОВ ПЕРЕХОДА ГРАНУЛЁЗНЫХ КЛЕТОК ЯИЧНИКОВ МЫШЕЙ ВО ВРЕМЕНИ

Мамедова А.Р.<sup>1,2,\*</sup>, Смольянинова Л.В.<sup>1,2</sup>, Антышева З.Г.<sup>3</sup>, Калужский И.Н.<sup>3</sup>, Богданов В.П.<sup>3</sup>, Замараев А.В.<sup>1,2</sup>, Копейна Г.С.<sup>1,2</sup>, Животовский Б.Д.<sup>1,2,4</sup>

1. ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

2. Факультет фундаментальной медицины МНОИ МГУ, Москва, Россия

3. Центр живых систем МФТИ, Москва, Россия

4. Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

\**tamedova.augun.99@mail.ru*

**Ключевые слова:** ПЦР, гранулезные клетки, самки мышей, пространственная транскриптомика.

Овуляция – это сложный высокодинамичный процесс, происходящий в течение нескольких минут или иногда часов в небольших пространственно-ограниченных нишах внутри яичника и включающий ряд молекулярных и структурных изменений, приводящих к разрыву фолликула и высвобождению ооцитов для оплодотворения. Успешная овуляция основана на точной координации и взаимодействии между различными типами клеток яичника как в пространстве, так и во времени. Однако клеточные и молекулярные механизмы, ответственные за контроль временной и пространственной специфики разрыва фолликула, остаются недостаточно изученными.

В связи с этим нами обработаны результаты пространственно-временного атласа яичников мышей в исследовании [1] и включающие данные пространственной транскриптомики (ПТ) образцов через 0, 1, 4, 6, 8 и 12 ч после обработки хорионическим гонадотропином (ХГ) человека (через 48 ч после инъекции гормонального препарата, содержащего ХГ лошади и сыворотку козы против ингибина). Анализ данных выявил динамические изменения экспрессии специфических маркеров в гранулезных клетках в зависимости от продолжительности обработки ХГЧ. Эти результаты, полученные на одной гормонально стимулированной мышце, были верифицированы методом количественной ПЦР (кПЦР) на расширенной когорте самок мышей линий FVB в половозрелом возрасте. Результаты кПЦР подтвердили временные паттерны экспрессии генов в гранулезных клетках, полученные по данным ПТ, в частности, для генов *Cyp19a1*, *Hsd17b1*, *Runx2*, *Timp1*, *Spp1*, *Ptgs1*, *Nts* и *Ptx3*.

Для *Cyp19a1* и *Hsd17b1* высокие уровни экспрессии были обнаружены в ранние сроки (через 0–2 ч после ХГЧ). Через 4 часа их экспрессия снижалась как минимум вдвое, достигнув почти неопределимых уровней между 6 и 12 часами после ХГЧ. Примечательно, что *Cyp19a1* продемонстрировал начальное повышение экспрессии через 2 часа после ХГЧ по сравнению с 0-1 часом, достигнув пика перед последующим снижением. Напротив, *Runx2* и *Timp1* показали низкую начальную экспрессию, но продемонстрировали постепенный рост с 4 до 12 часов пост-ХГЧ. Через 8 часов их экспрессия немного снизилась по сравнению с предыдущей временной точкой (6 часов пост-ХГЧ), однако оба гена достигли максимальных уровней через 12 часов после ХГЧ, что совпадало с овуляцией. Аналогичным образом, *Spp1* и *Ptgs1* продемонстрировали сопоставимую картину с более выраженными пиковыми уровнями экспрессии через 12 часов после ХГЧ. Гены *Nts* и *Ptx3* проявили колоколообразный профиль экспрессии: низкие уровни экспрессии наблюдались в течение 0–1 ч после ХГЧ, постепенно увеличивающиеся до пика при 4 ч, а затем снижающиеся к 12 ч пост-ХГЧ.

Полученные данные позволят лучше понять процесс созревания фолликулов и более точно описать изменения, приводящие к овуляции.

#### Список литературы

1. Mantri M. et al. A spatiotemporal molecular atlas of the ovulating mouse ovary // PNAS. 2024. Vol. 122, № 5. e2317418121.

## **A18. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК НЕК-293Т В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛЬНОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО В-ДЕФЕНЗИНА ЧЕЛОВЕКА 1**

Маркина М.П.<sup>1\*</sup>, Клычкова О.О.<sup>1</sup>, Ли А.А.<sup>1</sup>, Каширских Д.А.<sup>1</sup>, Хотина В.А.<sup>1</sup>, Гасанов В.А.<sup>1</sup>

*1. ЦКП «Группа геномных технологий», Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН*

*\* mmarkina46@gmail.com*

**Ключевые слова:** биотехнология, биоинженерия, генетические технологии

В связи с ростом устойчивости патогенных микроорганизмов к антибиотикам существует острая необходимость разработки новых антимикробных препаратов, обходящих стандартные механизмы формирования к ним бактериальной устойчивости.  $\beta$ -дефензины - это катионные пептиды с широким спектром антимикробной активности, которые экспрессируются всеми эпителиями человека [2].  $\beta$ -дефензин человека 1 (hBD1) устойчив к действию различных протеаз, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного антимикробного агента [3]. Создание эффективной системы для синтеза hBD1 позволит решить проблему с получением функционального пептида в необходимых терапевтических дозах для лечения различных бактериальных инфекций. В связи с этим, целью настоящей работы являлась генетическая модификация эукариотических клеток НЕК-293Т для получения клеточной платформы для экспрессии функционального hBD1.

Плазмидные конструкции pHDB1-Out и pHDB1RFP-Out были разработаны на основе вектора pcDNA3.1(+) с CMV-промотором. Основная вставка содержала ген hBD1 с лидерным пептидом SRP9. Плазида pHDB1RFP-Out дополнительно содержала ген красного флуоресцентного белка (RFP). Трансфекция НЕК-293Т осуществлялась методом липофекции. hBD1 был выделен из образцов лизатов и культуральных сред трансфецированных клеток и верифицирован с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Антимикробную активность модифицированных клеток оценивали с помощью диффузии лизатов и культуральных сред модифицированных клеток в лунки агар, обогащенного *E.coli* ( $1,45 \times 10^6$  КОЕ/мл), и сравнения диаметров зон подавления бактериального роста с контролем (ампициллин, 50 мкг/мкл).

В результате работы получены плазмиды pHDB1-Out и pHDB1RFP-Out. Эффективность трансфекции НЕК-293Т составила  $8,6 \pm 1,8\%$ . Анализ с помощью ВЭЖХ показал наличие hBD1 во всех клеточных лизатах и культуральных средах модифицированных клеток. Образцы трансфецированных НЕК-293Т также показали высокую антимикробную активность с зонами ингибирования бактериального роста на агаре 23,3-24,6 мм, что сравнимо с зонами подавления ампициллина (25,1 мм).

Таким образом, были успешно разработаны плазмиды pHDB1-Out и pHDB1RFP-Out, позволяющие получить экспрессию функционального hBD1 в клетках НЕК-293Т. Антимикробная активность лизатов и культуральных сред полученных клеток была сравнима с антимикробной активностью ампициллина, что свидетельствует о наличии экспрессии клетками функционального hBD1 и подтверждает эффективность модифицированных клеток в подавлении бактериального роста. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 0088-2025-0004).

Список литературы

1. Mathews M. и др. Production of  $\beta$ -Defensin Antimicrobial Peptides by the Oral Mucosa and Salivary Glands // Infect. Immun. American Society for Microbiology, 1999. Т. 67, № 6. С. 2740–2745.
2. Schroeder B.O. и др. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human  $\beta$ -defensin 1 // Nature. 2011. Т. 469, № 7330. С. 419–423.

## **Б30. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЦИТРУЛЛИНИРОВАНИЯ ГИСТОНОВ НА ДИНАМИКУ НУКЛЕОСОМ**

Матюшевская А.О.<sup>1\*</sup>, Федулова А.С.<sup>1</sup>, Кристовский Н.В.<sup>1</sup>, Шайтан А.К.<sup>1</sup>

*1. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова*

*\*matiushevskaiiaa@gmail.com*

**Ключевые слова:** молекулярное моделирование, метод молекулярной динамики

Нуклеосома представляет собой комплекс ДНК и октамера белков гистонов. Она участвует в структурной и функциональной организации хроматина. Контакт между ДНК и гистонами образуется за счет нескольких типов взаимодействий, главным образом электростатических, а стабилизация положения ДНК зависит от взаимодействия с внутренними неупорядоченными доменами гистонов – хвостами.

Известно, что посттрансляционные модификации (ПТМ) гистонов напрямую влияют на укладку хроматина в ядре и регулируют доступность хроматина для различных белковых факторов. Так, замены заряженных аминокислотных остатков на нейтральные приводят к ослаблению электростатических взаимодействий между ДНК и гистонами, а, следовательно, к разрыхлению хроматина. Этот эффект наблюдается при цитруллинировании, замене аргининов на цитруллины, происходящее в клетке в процессе нетоза [1,2].

Эффект ПТМ хвостов на динамику нуклеосомы можно исследовать методом молекулярной динамики (МД). Однако эта задача требует больших вычислительных мощностей, связанных с особенностями моделирования неупорядоченных структур. В силу высокой подвижности, хвосты гистонов принимают большое число конформаций [2], что значительно усложняет их исследование.

В работе методом МД исследовалось влияние цитруллинирования гистонов на динамику нуклеосомы. Этапы включали в себя параметризацию силового поля для цитруллинов, модификацию начальной структуры и проведение МД расчетов. Полученные динамические траектории сравнивались с известными траекториям неизмененных нуклеосом.

Показано, что цитруллинирование приводит к значительному снижению числа контактов между гистоновыми хвостами и ДНК. Наиболее выраженный эффект наблюдался для хвоста гистона H3, что коррелирует с наибольшим количеством замен в его составе. Полученные данные согласуются с гипотезой о дестабилизирующем влиянии цитруллинирования на структуру нуклеосомы.

Работа поддержана грантом № 23-44-00082. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

### **Список литературы**

1. Wang B. et al. Recent advances in characterization of citrullination and its implication in human disease research: From method development to network integration. // *Proteomics*. 2023. Vol. 23, № 21-22. P. e2200286.
2. Peng Y. et al. Binding of regulatory proteins to nucleosomes is modulated by dynamic histone tails. // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 5280.

## А19. РАЗРАБОТКА БИОСОВМЕСТИМЫХ НАНОВОЛОКОН С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Мерзликин В.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук*  
vasiliy.merzli@bk.ru

**Ключевые слова:** поли-3-гидроксibuтират, хлорофилл, электроспиннинг, антибактериальная активность, биоматериалы

Целью исследования является разработка биомиметических нетканых материалов на основе поли-3-гидроксibuтирата (ПГБ) с добавлением хлорофилла методом электроспиннинга для антибактериального применения. ПГБ, как природный биоразлагаемый полиэфир, обладает биосовместимостью и контролируемой биодegradацией, что делает его перспективным для медицинских приложений. Хлорофилл, благодаря антиоксидантным и фотодинамическим свойствам, придает материалам дополнительные функциональные характеристики.

Рабочие растворы ПГБ (7 масс.%) с хлорофиллом (0,5–1,5 масс.%) были приготовлены в хлороформе и смеси этанол-вода. Электроспиннинг проводили при напряжении 18 кВ, расстоянии между электродами 20 см и скорости подачи раствора 1 мл/ч. Полученные волокна имели средний диаметр 1,2–6 мкм и толщину полотна 150–200 мкм. Сканирующая электронная микроскопия показала, что добавление хлорофилла уменьшает структурные дефекты волокон, снижая их диаметр с 80–170 мкм до 50–100 мкм и размеры дефектов с 4–20 мкм до 2–7 мкм.

Микробиологические испытания на *Staphylococcus aureus* (штамм 209-P) выявили минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) 12,75 мкг/мл для свободного хлорофилла и 13 мкг/мл для комплекса ПГБ-хлорофилл. После облучения (450 нм) МИК снижалась до 10,25 и 10 мкг/мл соответственно. При концентрациях, превышающих МИК в два раза, наблюдалось подавление роста бактерий более чем на 99,5%, что указывает на выраженный бактерицидный эффект.

Полученные материалы демонстрируют потенциал для применения в регенеративной медицине и тканевой инженерии благодаря улучшенной морфологии и антибактериальной активности. Для подтверждения эффективности необходимы дальнейшие исследования *in vivo*.

Таблица 1: Антимикробная активность

Препарат МИК (мкг/мл)	Без облучения, МИК (мкг/мл)	После облучения (450 нм)
Хлорофилл	12,75 ± 0,5	10,25 ± 0,25
Комплекс ПГБ-Хл	13,0 ± 0,5	10,0 ± 0,5

Список литературы

1. Maliszewska, I.; Czapka, T. Electrospun Polymer Nanofibers with Antimicrobial Activity. *Polymers*, 2022, 14, 1661.
2. Tyubaeva, P.M.; et al. Assessing the Biodegradability of PHB-Based Materials with Different Surface Areas: A Comparative Study on Soil Exposure of Films and Electrospun Materials. *Polymers*, 2023, 15, 2042.

### **БЗ1. АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ НА ОСНОВЕ ЛИНЕЙНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ЯДА ПАУКА: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МОДЕЛЬНЫМИ ЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ И КЛЕТКАМИ**

Миронов П.А.<sup>1,2</sup>, Дубовский П.В.<sup>1</sup>, Баранова А.А.<sup>1</sup>, Алферова В.А.<sup>1</sup>, Егорова Н.С.<sup>1</sup>, Игнатова А.А.<sup>1</sup>, Феофанов А.В.<sup>1,2</sup>, Шенкарев З.О.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

<sup>2</sup> Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

\*[pavel.mironov@student.msu.ru](mailto:pavel.mironov@student.msu.ru)

**Ключевые слова:** антимикробные пептиды, липосомы, гемолиз, ЯМР-спектроскопия

Метициллин-резистентный штамм *Staphylococcus aureus* (MRSA) является серьёзной проблемой современной медицины (Abebe et al., 2023). Поиск новых эффективных антимикробных средств приобретает особую значимость. Одним из перспективных направлений являются пептиды на основе токсинов из яда пауков, обладающие способностью разрушать бактериальные мембраны.

Мы изучили линейные пептиды, полученные из фрагментов токсинов из яда паука с активностью против MRSA. Цель исследования – изучить, насколько мембранная активность пептидов определяет их антимикробную активность. Для этого мы использовали два активных пептида (IX, XIII) с амидированным С-концом и один неактивный (X) без амидированного С-конца.

Для моделирования взаимодействия пептидов с мембранами были использованы липосомы из 1,2-диолеил-фосфатидилхолина (DOPC) и 1,2-диолеил-фосфатидилглицерина (DOPG). Первый состав моделирует мембрану млекопитающих, а второй – грамположительных бактерий. Методом ЯМР-спектроскопии широких линий на ядрах <sup>31</sup>P было показано, что активный пептид IX дестабилизирует анионные липосомы DOPG, индуцируя появление изотропного сигнала в спектрах <sup>31</sup>P-ЯМР смесей пептид/DOPG, тогда как липосомы DOPC остаются стабильными. Добавление пептида IX приводит к уменьшению способности липосом к деформации в магнитном поле спектрометра, связанное со встраиванием пептида во внешний монослой липосом. Но только в случае с DOPG это ведет к его разрыву. Пептид X не вызывает появления изотропного сигнала в <sup>31</sup>P-ЯМР спектре. Он оказался нерастворимым при pH 7 и не проявлял антимикробной активности при pH 5, при котором растворимость была хорошей. Это указывает на то, что свободная С-концевая карбоксильная группа препятствует активности, уменьшая заряд пептида и его растворимость.

С помощью конфокальной микроскопии показано, что пептид XIII при концентрации, эквивалентной минимальной ингибирующей концентрации (MIC), вызывает быструю гибель клеток *S. aureus* (штамм 209P, в течение 15 минут). При этом гемолитическая активность пептида XIII значительно ниже, чем у пептида IX, что делает его перспективным кандидатом для лечения инфекций, вызываемых *S. aureus*, включая резистентные к традиционным антибиотикам.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 24-25-00160

#### **Список литературы**

1. Abebe A.A., Birhanu A.G. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms Underlying Drug Resistance Development and Novel Strategies to Combat // Infect Drug Resist. 2023. V. 16. P. 7641–7662.



## Б32. ИНТЕГРАЦИЯ РВРК-МОДЕЛИ С ВЕБ-ИНТЕРФЕЙСОМ: ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ И ТЕРАПИИ

Морус Е.В.<sup>1,2</sup>, Кудрявцев Д.С.<sup>1</sup>

1. ИБХ РАН

2. РУДН

**Ключевые слова:** Моделирование РВРК, аземиопсин, обыкновенные дифференциальные уравнения, интерфейс

Физиологически обоснованное фармакокинетическое моделирование представляет собой современный подход к прогнозированию поведения лекарственных веществ в организме, который особенно важен при работе с новыми соединениями и разработке персонализированных терапевтических стратегий. В рамках данного исследования была разработана универсальная РВРК-модель, способная описывать распределение различных фармакологических агентов, а в качестве демонстрационного примера выбран аземиопсин – перспективный пептидный миорелаксант. Модель построена на системе обыкновенных дифференциальных уравнений и охватывает 13 ключевых физиологических компартментов, включая кровь, печень, почки, лёгкие, сердце, мышечную и жировую ткани, мозг, кости, кишечник, селезёнку, кожу и прочие ткани.

Особенностью разработки является её комплексный характер: модель интегрирует как экспериментально определяемые параметры ( $\log P$ , несвязанная фракция препарата, печеночный клиренс), так и литературные данные ( $pK_a$ ), что обеспечивает физиологическую достоверность прогнозов.

Полная реализация в среде R с использованием пакета deSolve для численного интегрирования уравнений гарантирует прозрачность методологии и воспроизводимость результатов, а интеграция с веб-интерфейсом на Shiny/plotly предоставляет исследователям интуитивный инструмент для работы с моделью. Интерфейс позволяет гибко варьировать параметры введения веществ, индивидуальные физиологические характеристики (масса тела, возраст, функциональное состояние печени и почек), что делает модель адаптируемой под различные исследовательские задачи.

Применительно к аземиопсину модель продемонстрировала характерную фармакокинетику с выраженным накоплением в мышечной ткани при дозировке 0.15 мг/кг и более быстрым выведением из системного кровотока. Это подтверждает целесообразность его исследования как миорелаксанта и иллюстрирует способность модели выявлять тканеспецифичное распределение веществ. Дополнительная ценность модели раскрывается в модуле, описывающем взаимодействие "антиген-антитело" по схеме:



где  $Az$  - моделируемое вещество (в данном случае аземиопсин),  $Ab$  - антитод (антитело),  $B$  – комплекс, антитодом,  $B$  — комплекс,  $k_{on}/k_{off}/k_{degr}$  — константы образования/распада комплекса/деградации вещества. Данный модуль позволяет исследовать сценарии принудительной элиминации вещества из организма, учитывая константы образования и распада комплекса, а также деградации его компонентов. Моделирование показало, что введение антитела через 15 минут после препарата существенно ускоряет клиренс, причем временной интервал и скорость введения обоих агентов являются критически важными параметрами.

Практическая ценность разработки заключается в её универсальности и гибкости. Модель позволяет проводить *in silico* скрининг режимов дозирования, анализировать лекарственные взаимодействия, оптимизировать доклинические исследования и прогнозировать индивидуальные реакции, что способствует развитию персонализированной терапии и ускорению перехода от экспериментальных данных к клиническому применению.

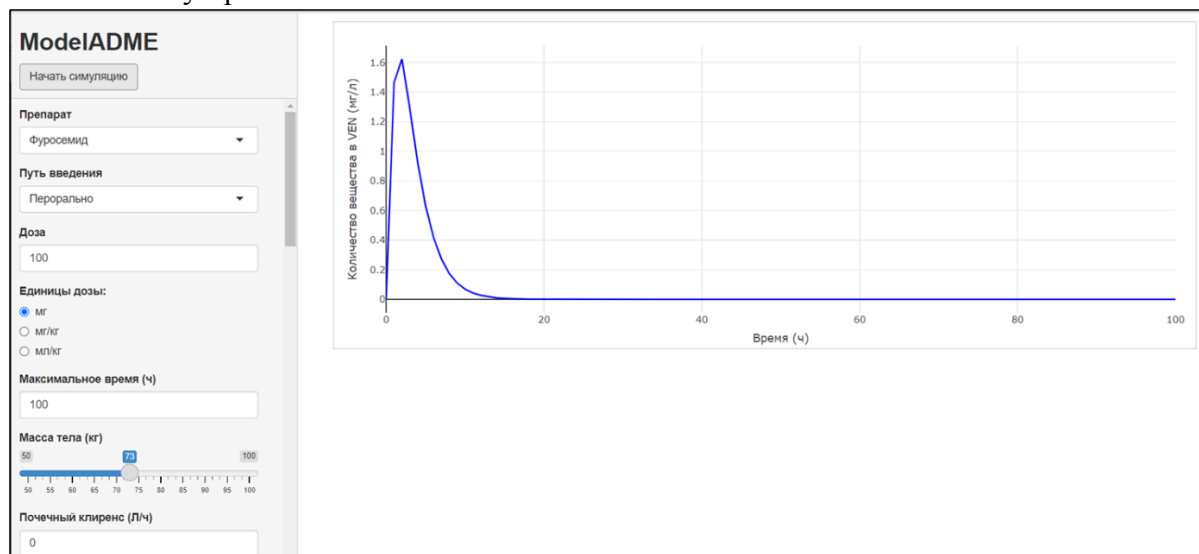


Рисунок 1 – Общий вид интерфейса приложения.

### **Б33. ИЗУЧЕНИЕ ЦИТРУЛЛИНИРОВАНИЯ НУКЛЕОСОМНОЙ КОРОВОЙ ЧАСТИЦЫ ФЕРМЕНТОМ PAD4**

Моторин Н.А.<sup>1</sup>, Миронов П.А.<sup>1,2</sup>, Пантелеев М.А.<sup>3,4,5</sup>, Шенкарев З.О.<sup>2</sup>, Шайтан А.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, 119234, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра медицинской физики Россия, 119991, Москва, Россия

<sup>4</sup>ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 117997, Москва, Россия

<sup>5</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 109029, Москва, Россия

\*n.motorin@intbio.org

Нуклеосома является элементарной структурной единицей хроматина и представляет собой комплекс, состоящий из гистоновых октамера и ДНК длиной около 147-145 п.н. Структурная динамика нуклеосом и хроматина в целом подлежит регуляции в ряде важных для биомедицины процессах. Так, например, участником тромбообразования и врожденного иммунитета, является процесс, называемый НЕТозом (англ. NETosis от англ. Neutrophil extracellular traps), включающий формирование нейтрофилами ДНК-ловушек. НЕТоз реализуется с участием фермента PAD4, вносящего модификацию цитруллинирования в гистоны и способствующую деконденсации хроматина. Однако эффект данной модификации на уровне нуклеосом, включая возможную роль в дестабилизации нуклеосом, остается изученным недостаточно и требует дальнейших исследований.

В нашей работе мы исследовали эффективность внесения цитруллинирования в нуклеосомные коровые частицы (NCP) коммерческим PAD4 (Sigma SAE0086) с использованием метода ЯМР-спектроскопии, а также эффект данной модификации на стабильность нуклеосомных коровых частиц с помощью нативного электрофореза.

Образцы NCP, состоящие из канонических гистонов человека (включая <sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C-H3.1) и ДНК последовательности Widom 601, были подготовлены в соответствии с методикой, описанной в работе [1]. В дальнейшем NCP были обработаны PAD4. С помощью нативного гель-электрофореза не было выявлено значительных отличий препарата необработанных NCP и обработанных PAD4. Внесение модификаций ферментом PAD4 было подтверждено с помощью метода ЯМР-спектроскопии по спектрам <sup>13</sup>C-HSQC, снятым до и после обработки ферментом. После добавления PAD4 и инкубации при 37 °C в спектрах наблюдали появление дополнительных сигналов Cδ атомов цитруллина. По соотношению интенсивности сигналов Cδ атомов аргининов и цитруллинов установлено, что фермент модифицировал ~85% аргининов в NCP, сигналы от которых наблюдали в спектре.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности внесения цитруллинирования в NCP ферментом PAD4, при этом наши данные не демонстрируют прямого эффекта этой массовой модификации на дестабилизацию NCP в виде диссоциации нуклеосомной ДНК, что открывает перспективы изучения эффектов цитруллинирования методами структурной биологии.

Работа поддержана грантом РФФ № 25-14-00046.

Список литературы

1. Armeev GA, Moiseenko AV, Motorin NA, et al. Structure and dynamics of a nucleosome core particle based on Widom 603 DNA sequence. *Structure*. 2025;33(5):948-959.e5. doi:10.1016/j.str.2025.02.007.

# БЗ4. ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДИЛТРАНСФЕРАЗЫ С ПОМОЩЬЮ ИТЕРАТИВНОГО МУТАГЕНЕЗА И КОМПЬЮТЕРНОГО ДИЗАЙНА

Никитеев И.А. <sup>1\*</sup>, Кузьмина Ю.Е. <sup>1</sup>, Рог И.С. <sup>1</sup>, Бугрова А.Д. <sup>2</sup>, Гушин И.Ю. <sup>2</sup>, Набережнов Д.С. <sup>1</sup>, Шевелёва М.П. <sup>3</sup>, Максименко О.Г. <sup>4</sup>, Зайнуллин К.Ф. <sup>1</sup>, Фёдоров О.В.

1. НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия

2. Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

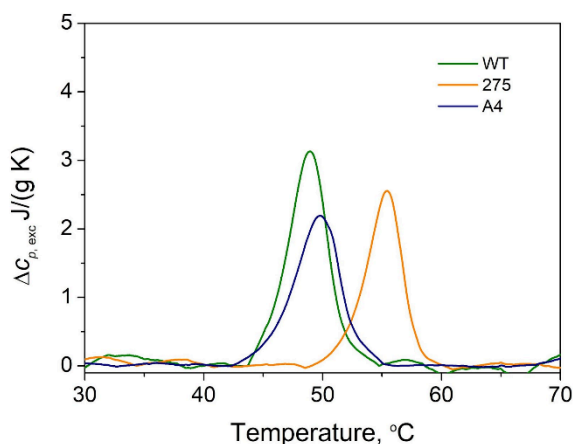
3. Институт биологического приборостроения РАН, Пущино, Россия

4. Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

\*nikiteev.ilya@mail.ru

**Ключевые слова:** Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), белковый инжиниринг, термостабильность, ферментативный синтез ДНК

Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (TdT) является ключевым ферментом для технологии ферментативного синтеза ДНК, однако ее применение ограничено низкой термостабильностью и низким выходом при рекомбинантной экспрессии. Целью данной работы было комплексное улучшение свойств TdT из *Mus musculus* с фокусом на этих двух параметрах. Мы применили синергетический подход, комбинируя итеративный насыщающий мутагенез (ISM) структурно гибких участков, определенных по В-фактору, с рациональным дизайном на основе предсказаний нейросетевых алгоритмов. В результате были созданы два уникальных варианта фермента с разными, но одинаково важными для биотехнологии преимуществами. Первый вариант, A4, полученный исключительно методом ISM, продемонстрировал впечатляющий 26-кратный рост уровня экспрессии по сравнению с белком дикого типа, что критически важно для рентабельного производства. Второй вариант, 275, созданный на основе мутанта A4, показал значительное повышение термостабильности: его температура плавления ( $T_m$ ) увеличилась на 6.5°C, а период полураспада при 45°C вырос более чем в 120 раз. Оба мутанта сохранили высокую каталитическую активность. Таким образом, в ходе работы были получены высокотехнологичные и стабильные белковые матрицы TdT, являющиеся перспективной основой для дальнейшего инжиниринга и применения в системах ферментативного синтеза ДНК *de novo*.



**Рисунок 1.** Зависимость избыточной теплоемкости от температуры для образцов TdT дикого типа (WT), мутантов 275 и A4, полученная методом ДСК.

Исследование поддержано государственным заданием РФ № 125041005130-8.

### **Б35. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ГИСТАТИНА 5 В *E. COLI*.**

Новикова В.С.<sup>1,2\*</sup>, Ли А.А.<sup>1</sup>, Каширских Д.А.<sup>1</sup>, Хотина В.А.<sup>1</sup>, Гасанов В.А.<sup>1</sup>

1 ЦКП «Группа геномных технологий», Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

2 Кафедра биотехнологии, ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева

\*reddkk@bk.ru

**Ключевые слова:** антимикробные пептиды, биотехнология, биоинженерия

Целью данного исследования была разработка метода биотехнологического получения функционально активного антимикробного пептида гистатина 5 (Hst5) в рекомбинантной форме. Актуальность работы обусловлена растущей устойчивостью патогенов к традиционным антибиотикам, требующей поиска альтернативных средств, таких как антимикробные пептиды. Перспективным кандидатом является гистатин 5, проявляющий выраженную антибактериальную и фунгицидную активность [1]. Поскольку промышленный химический синтез пептида сопряжен со значительными затратами и технологическими трудностями, наиболее целесообразной альтернативой ему является рекомбинантное производство в бактериальных системах. Основным препятствием для рекомбинантного получения гистатина 5 в бактериях является его токсичность для клетки-продуцента. Ключевая идея работы заключалась в преодолении этого ограничения путем синтеза пептида в неактивной кассетной форме, представляющей собой несколько копий пептида, объединенных в один полимерный пептид, не оказывающий токсического действия на бактерию во время экспрессии, с дальнейшим высвобождением активных мономеров гистатина 5 путем химического расщепления.

В ходе работы были сконструированы плазмидные векторы на основе pET30(a), кодирующие мономерную (pH5) и кассетную (p10xH5) формы Hst5. Экспрессию пептидов проводили в штамме *E. coli* BL21(DE3), после чего целевой продукт выделяли из кассетной формы с помощью гидролиза бромцианом и очищали методом ионообменной хроматографии, качество очистки контролировали методом электрофореза в ПААГ, концентрацию пептида определяли методом Брэдфорда. В результате были оптимизированы условия индукции экспрессии и очистки. Установлено, что при концентрации IPTG 200 мкМ экспрессия кассетной формы 10xH5 детектируется через 60 минут после индукции и достигает максимума через 90 минут. В отличие от него, мономерный H5 не экспрессировался, что подтверждает его токсичность для клеток *E. coli*. Концентрация гистатина 5, полученного после расщепления кассеты, составила 280,7 мкг/мл. При подтверждении функциональной активности пептида методом диффузии в агаре было установлено, что его антимикробное действие оказалось сопоставимо с антибиотиком ампициллином (50 мг/мл), о чем свидетельствовал диаметр зоны ингибирования роста инокулированных в агар бактерий (21,23 мм).

Таким образом, была успешно продемонстрирована возможность получения биологически активного гистатина 5 с использованием бактериальной системы экспрессии. Разработанный подход перспективен для создания новых антимикробных препаратов и может быть адаптирован для производства других терапевтических пептидов. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2025-464 от 29.05.2025 г).

Список литературы

1. Khurshid Z. et al. Histatin peptides: Pharmacological functions and their applications in dentistry //Saudi Pharmaceutical Journal. – 2017. – T. 25. – №. 1. – C. 25-31.

### **Б36. ОЦЕНКА АФФИННОСТИ НУКЛЕОСОМ-СВЯЗЫВАЮЩИХ ПЕПТИДОВ МЕТОДОМ ТУШЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ FRET**

Олейников П. Д.<sup>1\*</sup>, Армеев Г.А.<sup>1</sup>, Шайтан А.К.<sup>1</sup>

*1. Биологический факультет, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

*\*pasha.olejnikoff@yandex.ru*

**Ключевые слова:** нуклеосомы, пептиды, константа диссоциации, FRET

Ядро клетки, являясь одной из ключевых структур эукариотических клеток участвующих в организации жизненно-важных процессов, содержит ДНК в виде хроматина - комплекса ДНК и гистоновых белков. Структурной и функциональной единицей хроматина считается нуклеосома, состоящая из октамера гистонов и фрагмента ДНК длиной 147 пар нуклеотидов, обернутого вокруг него. Интересно, что на поверхности нуклеосом существует отрицательно заряженная область гистонического димера H2A - H2B, называемая “кислотный лоскут” или “acidic patch”, служащая платформой для связывания с нуклеосомной многих коротких пептидных мотивов белков, в том числе белков, связанных с ремоделированием хроматина, модификаторов хроматина и даже вирусных белков. Таким образом, изучение взаимодействий различных белков и пептидов с кислотным лоскутом нуклеосом интересно не только с фундаментальной, но и с практической точек зрения.

В данной работе был оптимизирован метод тушения флуоресценции FRET для измерения констант диссоциации комплексов нуклеосома - пептид. Метод основан на Ферстеровском резонансном переносе энергии и позволяет вычислять значения константы диссоциации комплексов при измерении снижения флуоресценции донорной флуоресцентной метки, прикрепленной к супервитку нуклеосомной ДНК в положении наиболее близком к кислотному лоскуту нуклеосомы, при связывании нуклеосом-связывающего пептида с флуоресцентной меткой - акцептором. Предложенный метод был использован для измерения констант диссоциации комплексов нуклеосом с пептидами, в том числе с пептидом LANA(1-22), фрагмента вирусного антигена, обеспечивающего закрепление на хромосоме хозяина эписомы герпесвируса, ассоциированного с Саркомой Капоши (KSHV).

Результаты данной работы расширяют методологический инструментарий для изучения механизмов взаимодействия белков хроматина с нуклеосомами, в частности для оценки аффинности связывания с нуклеосомой искусственных пептидов, созданных с применением технологий искусственного интеллекта, и представление о потенциальном применении нуклеосом-связывающих пептидов для создания искусственных инструментов для регуляции функционирования 3D генома.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда (номер 25-14-00046).



## **A20. АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО АЛЬГИНАТА С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ЭНДОЛИЗИНОМ**

Орлов М.Ю.\*<sup>2</sup>, Дудун А.А.<sup>3</sup>, Васина Д.В.<sup>4</sup>, Бонарцев А.П.<sup>1</sup>

*1 Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоинженерии*

*2 Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики*

*3 ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н.Баха.*

*4 Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи*

*\*o.mike.u@live.ru*

**Ключевые слова:** биотехнология, динамическое светорассеяние, ИК-спектроскопия

Проблема распространения мультирезистентных бактериальных штаммов, осложнённая способностью некоторых видов бактерий к формированию биоплёнок, стимулирует поиск новых терапевтических средств и эффективных систем их доставки. Одним из наиболее перспективных направлений является применение энзимиотиков – ферментов вирусного происхождения с антимикробной активностью, обладающих узкой специфичностью, низкой токсичностью и сниженной вероятностью формирования резистентности. В данной работе были исследованы гидрогели на основе различных вариантов бактериального альгината, модифицированных гибридным эндолизином LysECD7-SMAP [1], проявляющим широкий спектр антимикробного действия.

Цель исследования заключалась в анализе специфики образования безкатионных альгинатных гидрогелей с эндолизином, а также в установлении механизмов их межмолекулярной организации. В ходе работы были изготовлены образцы гидрогелей с различными свойствами за счет варьирования средней молекулярной массы цепи альгината, полученного методом контролируемого биосинтеза штаммом-продуцентом *Azotobacter vinelandii* 12 [2], присутствия катионов металлов 2+ и концентраций компонентов. Методами динамического светорассеяния установлено, что концентрация эндолизина LysECD7-SMAP определяет количество частиц в системе, при этом наблюдается близкая к линейной зависимость, что указывает на ведущую роль глобулы белка эндолизина в образовании коллоидных комплексов. Размерные характеристики частиц варьировали незначительно и не коррелировали с молекулярной массой альгината, что свидетельствует о формировании унифицированных коллоидных структур.

Сравнительная ИК-спектроскопия образцов лиофилизированного гидрогеля относительно сухого альгината продемонстрировала усиление в показателях для полос поглощения, соответствующих растяжению ковалентных связей в карбоксильных и С-Н группах, что указывает на образование ими водородных и электростатических межмолекулярных взаимодействий и их участие в стабилизации коллоидных структур. На основании совокупности данных предложена модель организации частиц, согласно которой глобулы эндолизина окружены цепями альгината, образующими сетку водородных и ионных связей.

Результаты подтверждают наличие перспективы в возможности получения безкатионных гидрогелей на основе бактериального альгината и рекомбинантных эндолизинов, что открывает перспективы разработки новых биосовместимых материалов для инкапсуляции энзимиотиков и создания инновационных антибактериальных систем.

Список литературы:

1. Vasina D.V., Antonova N.P., Gushchin V.A., et al. Development of novel antimicrobials with engineered endolysin LysECD7-SMAP to combat Gram-negative bacterial infections // *Frontiers in Microbiology*. 2023. Vol. 14. 1122512.
2. Dudun A.A., Akoulina E.A., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Voinova V.V., Belishev N.V., Khaydapova D.D., Shaitan K.V., Bonartseva G.A., Bonartsev A.P. Competitive biosynthesis of bacterial alginate using *Azotobacter vinelandii* 12 for tissue engineering applications // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2024. Vol. 60. P. 821–832.

### **Б37. ПОДАВЛЕНИЕ АНТИАПОПТОТИЧЕСКОГО БЕЛКА MCL-1 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ: МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ И СПОСОБЫ ЕЕ ПРЕОДОЛЕНИЯ**

Первушин Н.В.<sup>1,2\*</sup>, Вальдес Фернандес Б.И.<sup>2</sup>, Сеничкин В.В.<sup>2</sup>, Япрынцева М.А.<sup>1,2</sup>, Павлов В.С.<sup>1</sup>, Животовский Б.<sup>1,2,3,\*</sup>, Копейна Г.С.<sup>1,2\*</sup>.

1. *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991, Россия*

2. *Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Россия*

3. *Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, 17177, Стокгольм, Швеция*

*\*rhododendron.nick@mail.ru*

**Ключевые слова:** Mcl-1, устойчивость, апоптоз, онкология

В ходе канцерогенеза клетки способны приобретать адаптационные преимущества и вырабатывать устойчивость к различным типам программируемой гибели клеток, включая апоптоз, который играет ключевую роль в противоопухолевой защите организма. Активация апоптоза в злокачественных клетках является перспективной тактикой лечения онкологических заболеваний [1]. Важными регуляторами апоптоза являются белки семейства Bcl-2, которые образуют между собой белок-белковые комплексы и по функциональным свойствам подразделяются на белки, способствующие выживанию (антиапоптотические) и гибели (проапоптотические) клеток [2].

Увеличение уровней антиапоптотических членов семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) является одной из распространенных причин устойчивости опухолевых клеток к апоптозу. В настоящее время для преодоления данного типа устойчивости активно используются ВНЗ-миметики – соединения, которые имитируют действие проапоптотических белков семейства Bcl-2 и подавляют действие их антиапоптотических партнеров. Селективный антагонист белка Bcl-2 Венетоклакс одобрен для лечения пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом, а ингибиторы Bcl-xL и Mcl-1 исследуются в клинических испытаниях [2].

Развитие лекарственной устойчивости является серьезной проблемой противоопухолевой терапии. Как и многие препараты, ВНЗ-миметики могут терять свою эффективность вследствие появления к ним в опухолевых клетках приобретенной устойчивости [2]. В нашей работе были получены три опухолевые линии клеток различного происхождения (аденокарцинома шейки матки HeLa, аденокарцинома легкого H23 и нейробластома SK-N-Be(2)c), устойчивые к действию селективного антагониста Mcl-1 S63845. При помощи различных методов было подтверждено наличие устойчивости к S63845 в указанных клеточных популяциях, а также установлены наиболее вероятные причины ее появления. Так, в двух резистентных линиях наблюдалось увеличение экспрессии генов двух антиапоптотических белков – Bcl-2 (SK-N-Be(2)c) или Bcl-xL (HeLa), которые компенсируют ингибирование Mcl-1. В ходе экспериментов по подавлению Mcl-1 при помощи миРНК-интерференции выявлено, что резистентные клетки SK-N-Be(2)c и HeLa стали менее зависимыми от работы Mcl-1. В то же время третья устойчивая линия H23 характеризовалась повышенной метаболической активностью, вклад которой в развитие данного типа устойчивости был подтвержден в экспериментах с ингибиторами клеточного дыхания (Ротенон, ТТФА, Олигомицин). При помощи методов секвенирования (метод Сэнгера и NGS) ни в одной из моделей не были обнаружены мутации, приведшие к изменению структурно-функциональных свойств белков Mcl-1 и его проапоптотического партнера

Вак в отличие от ранее детектированных изменений в генах белков Bcl-2 и Bax в Венетоклак-устойчивых клонах [2]. Таким образом, полученные результаты демонстрируют многофакторность механизмов развития приобретенной устойчивости опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (проект № 23-74-30006).

#### Список литературы

1. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions // *Cancer Discovery*. 2022. Vol. 12. P. 31–46.
2. Senichkin V.V. et al. Targeting Bcl-2 Family Proteins: What, Where, When? // *Biochemistry (Moscow)*. 2020. Vol. 85, № 10. P. 1210–1226.

## **A21. МОДЕЛИРОВАНИЕ МИННО-ВЗРЫВНОЙ РАНЫ КОЖИ И МЫШЦ У МЫШЕЙ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Пермякова А.А.<sup>1,2</sup>, Стулова А. А.<sup>1</sup>, Кузьменко Е.В.<sup>1</sup>, Ржанова Л.А.<sup>1</sup>, Рябинин А.А.<sup>1</sup>, Моргун Е.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Минно-взрывные повреждения представляют собой один из наиболее тяжёлых видов боевой травмы и характеризуются сочетанным действием ударной волны, осколков и термического фактора [3]. Для оценки эффективности новых терапевтических средств необходимы адекватные доклинические модели, имитирующие патогенез подобных ранений. Существующие методы воспроизведения взрывных ран у крыс [1, 2] основаны на применении пиротехнических изделий, требующих поджига, что сопровождается плохо контролируемым горением, снижает воспроизводимость и небезопасно для исследователей. Кроме того, данные модели неприменимы для мышей из-за их размеров.

Таким образом, цель данной работы – разработка простой, безопасной и воспроизводимой модели минно-взрывной раны у мышей, включающей основные поражающие факторы — взрыв, осколочное и термическое воздействие — без использования открытого пламени.

Эксперименты проводились на самцах мышей линии C57BL/6 массой 18–22 г. После введения животных в наркоз выполняли разрез кожи по центру голени длиной 10–15 мм и рассечение мышц на глубину 5–8 мм. В сформированный мышечный карман помещали миниатюрную петарду, представляющую собой бумажный мешочек с зарядом бертолетовой соли. Активацию заряда осуществляли механическим сжатием пинцетом без поджога. В результате происходил локальный взрыв, сопровождающийся воздействием ударной волны, повышением температуры и внедрением в ткани частиц бертолетовой соли, имитирующих действие осколков.

Сразу после взрыва формировался овальный дефект тканей с рваными краями, диффузными кровоизлияниями и признаками ожоговой травмы. Кристаллы бертолетовой соли удалялись из раны пинцетом. На 5-е сутки после травмы поверхность раны была покрыта плотным струпом. Гистологически выявлялись участки некроза, истончённые мышечные волокна, выраженная инфильтрация полиморфоядерными лейкоцитами и макрофагами, гиперпролиферация эпидермиса по краям дефекта. На 7-е сутки наблюдалось формирование грануляционной ткани и появление мышечного регенерата.

Предложенная модель позволяет воспроизводить ключевые патогенетические факторы минно-взрывной травмы в контролируемых условиях, является безопасной для исследователей, стандартизируемой и применимой для доклинических испытаний биомедицинских продуктов, направленных на стимуляцию регенерации мягких тканей.

Работа выполнена в рамках государственного задания No 0088-2024-0013 Института биологии развития РАН им. Н.К. Кольцова

1. Zakharov P. [и др.]. Structural and ultrastructural changes in skeletal muscle tissue after high-energy injury in the early post-traumatic period // *Morphology*. 2025.
2. Шперлинг И.А. и др. Способ моделирования взрывной травмы мягких тканей конечности.
3. Chizh N. A. [и др.]. Модель минно-взрывной травмы // *Klinicheskaja khirurgia*. 2019. № 1 (85). С. 61–64.

## **А22. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОАНГИОГЕННЫХ СВОЙСТВ КОЛЛАГЕНОВЫХ И ЭЛАСТИНОВЫХ БАРЬЕРНЫХ МЕМБРАН В МОДЕЛИ ГЕТЕРОТОПИЧЕСКОЙ ИМПЛАНТАЦИИ КРЫСАМ IN VIVO**

Петрова С.А.<sup>1\*</sup>, Пятина К.В.<sup>2</sup>, Звягина А.И.<sup>2</sup>, Минайчев В.В.<sup>2</sup>, Корх А.А.<sup>1</sup>, Фадеева И.С.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>ФГБОУВО Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

\*sofya.petrova.2004@bk.ru

**Ключевые слова:** направленная регенерация тканей, барьерные мембраны, коллаген, эластин

В челюстно-лицевой хирургии успех направленной регенерации тканей с использованием барьерных мембран (БМ) зависит от эффективного кровоснабжения регенерата. Недостаточное кровоснабжение может привести к замедлению регенерации и развитию воспаления, увеличивая риск отторжения имплантата. Для нивелирования осложнений БМ должны активно стимулировать ангиогенез в тканях реципиента. Наиболее перспективными на сегодняшний день являются резорбируемые БМ на основе коллагенового матрикса, получаемого различными способами экстракции. Однако остаётся нерешённым вопрос, какой из методов экстракции обеспечивает получение матрикса с наиболее выраженным стимулирующим эффектом на васкуляризацию. Помимо этого ранее в нашей лаборатории было установлено, что эластин обладает выраженным ангиогенным эффектом *in vivo* <sup>[1]</sup>, Это указывает на потенциальный путь модификации существующих коллагеновых мембран для придания им дополнительных активных ангиогенных свойств.

В работе проводилось сравнительное *in vivo* исследование проангиогенных свойств коллагеновых и эластиновых барьерных мембран в модели гетеротопической (подкожной) имплантации крысам.

Для получения матриксов использовали фрагменты бычьего перикарда. Коллагеновые матриксы получали из основной части перикарда, децеллюляризируя их методами: обработкой 0,5% раствором дезоксихолата натрия (ОЧ\_ДХН); обработкой гипотоническим шоком (ОЧ\_ГШ). Эластиновые матриксы получали области прикрепления связок перикарда путём температурной обработки (СА\_АВТ) и щелочного гидролиза (СА\_NaOH). Полученные матриксы имплантировали крысам подкожно сроком на 13 недель с последующим морфогистохимическим анализом эксплантированных образцов.

В группе ОЧ\_ДХН выявлено умеренное количество кровеносных сосудов (10–20 на поле зрения) без лейкоцитарной инвазии и фиброза, указывающее на стабильное вращение сосудов. В ОЧ\_ГШ количество сосудов уменьшено (5–10 на поле зрения), имеется лейкоцитарная инвазия и фиброз. В СА\_авт выявлено наибольшее количество сосудов (до 30 на поле зрения), подтверждающее проангиогенные свойства эластина. В СА\_NaOH количество сосудов значительно ниже (до 10 на поле зрения).

Таким образом, среди эластиновых материалов наиболее выраженными проангиогенными свойствами обладают матриксы, полученные температурной обработкой, среди коллагеновых – матриксы, полученные ДХН. Полученные данные позволяют оптимизировать выбор мембран для челюстно-лицевой хирургии и разработать комбинированные материалы с улучшенными регенеративными свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №24-73-10208 «Разработка инъектируемых кальцийфосфатных гидратированных паст для

малоинвазивного введения и полярно реминерализованных композитных барьерных мембран с целью направленной регенерации тканей в травматологии и челюстно-лицевой хирургии».

Список литературы:

1. Zvyagina A. et al. Elastin barrier membranes for guided tissue regeneration technologies // BIO Web of Conferences. – EDP Sciences, 2023. – Т. 57. – С. 04002.

### **Б38. ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА С ПОЛИЛИЗИНОВЫМ КЛАСТЕРОМ НА АКТИВНОСТЬ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОГО КАЛИЕВОГО КАНАЛА Kv11.1**

Пивоваров Е. М.<sup>1\*</sup>, Ли Б.<sup>2</sup>, Соколова О. С.<sup>1,2</sup>

1. Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/73, Москва, 119234, Россия

2. Биологический факультет Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Гоцзидасюэюань, 1, Даюньсиньчэн, район Лунган, Шэньчжэнь, 518172, Китайская Народная Республика  
\*pivovarovem@my.msu.ru

**Ключевые слова:** Kv11.1, пептидные модуляторы, полилизиновый кластер

Kv11.1 определяет быстрый ток калия в фазе реполяризации кардиомиоцитов и обладает восприимчивостью к большому кругу различных модуляторов [1]. Среди пептидных модуляторов Kv11.1 на данный момент известны некоторые блокаторы из ядов скорпионов, действующие с экстраклеточной стороны и в основном вызывающие изменения в селективном фильтре [2, 3].

В данной работе мы охарактеризовали два новых пептида, содержащих полный и частично нарушенный (мутантный) полилизиновый кластер, соответственно, действующих с внутриклеточной стороны. Показано снижение плотности тока (рис.1А) и ускорение кинетики деактивации Kv11.1 (рис.1Б) при его коэкспрессии с данными пептидами с помощью метода локальной фиксации потенциала. С помощью иммуноблоттинга отмечено отсутствие изменения общей экспрессии Kv11.1, при этом экспрессия репортерного белка практически отсутствовала в одной из групп, что может указывать на возможный цитотоксический эффект пептида с полным полилизиновым кластером. Для определения механизма связывания пептидов были рассчитаны карты электростатических потенциалов Kv11.1 (рис.1Д) и проведен молекулярный докинг с помощью AutoDock CrankPer. В результате анализа ансамблей конформаций было показано, что оба пептида ориентируются в область локального отрицательного потенциала, создаваемого остатками домена, связывающего циклические нуклеотиды (CNBD) (рис.1В); при этом замена одного из лизинов в кластере на аргинин ведет к расширению ансамбля конформаций и большей представленности мутантного пептида в области С-линкера Kv11.1 (рис.1Г), образующего область локального положительного потенциала. Учитывая наличие отрицательно заряженных областей в структуре Kv11.1 наравне с положительно заряженными пептидными мотивами в его неупорядоченных регионах, а именно – сигнала ядерной локализации в области С-терминального домена [4], полученные результаты позволяют по-новому взглянуть на влияние CNBD на активность Kv11.1. С другой стороны, подобные максимумы отрицательного электростатического потенциала позволяют предполагать возможный сайт связывания положительно заряженных вторичных мессенджеров. В дальнейшем планируется провести молекулярно-динамические расчеты для релаксации структур докинга для получения более корректного представления об интерфейсе взаимодействия, изучить влияние данных пептидов на внутриклеточное распределение Kv11.1 с помощью непрямой иммунофлуоресценции и экспериментально установить участок связывания пептидов *in vitro*.

Таким образом, упомянутые положительно заряженные пептиды являются новыми потенциальными блокаторами Kv11.1 и позволяют глубже понять механизм функционирования калиевых потенциал-зависимых ионных каналов.



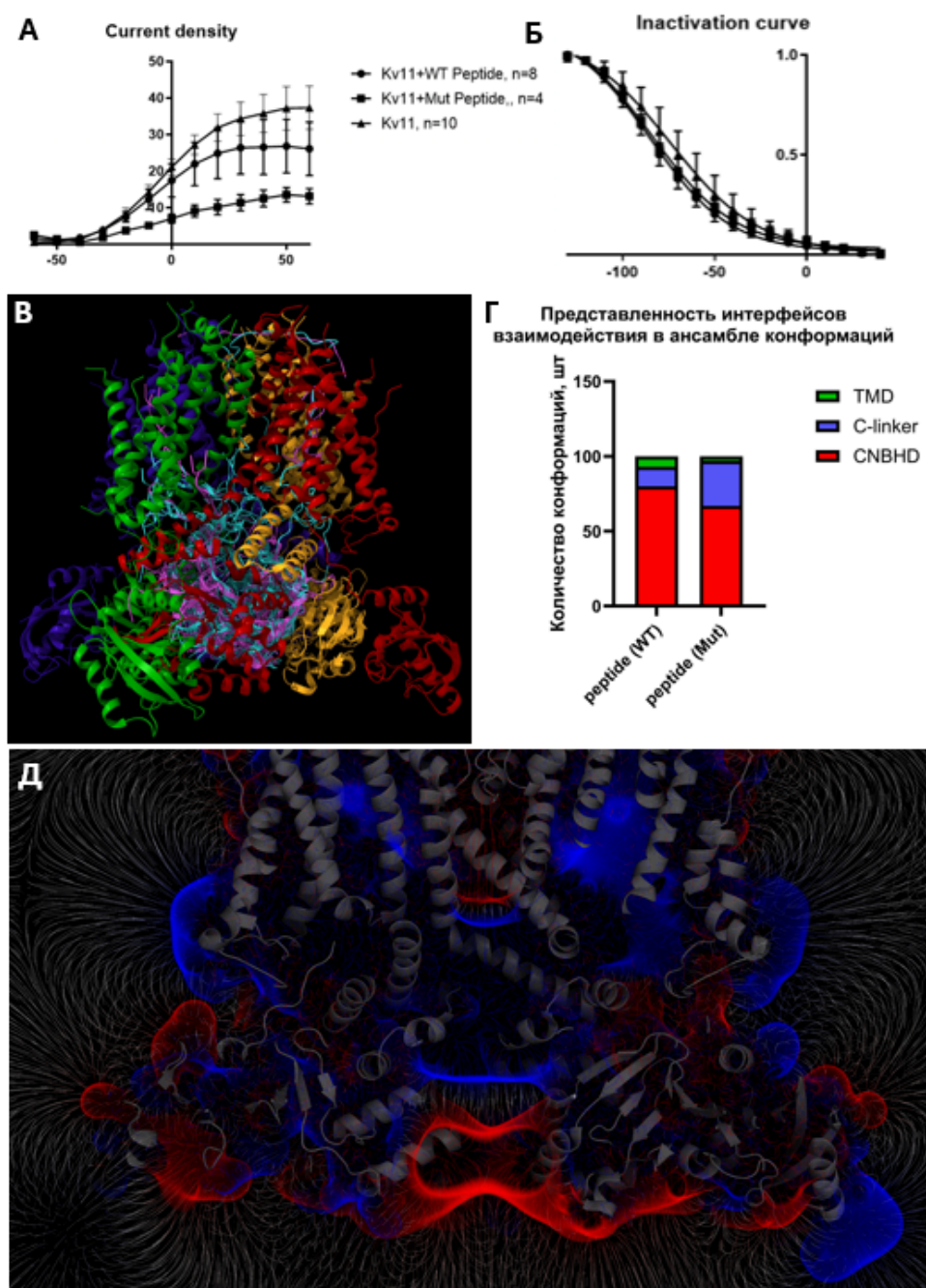


Рис.1 А – сравнение вольт-амперных кривых хвостового тока в клетках, котрансфицированных плазмидой с кодирующей последовательностью пептида с полным (WT) и нарушенным полилизиновым кластером (Mut) и плазмидой с геном Kv11.1. N – количество клеток в выборке. Б – сравнение потенциалов полуинактивации для вышеупомянутых групп. В – суперпозиция ансамблей конформаций для двух вариантов пептида (циан – Mut, маджента – WT). Показаны топ-100 вариантов в каждом случае, ранжированные по энергии связывания. Синим, красным, желтым и зеленым показаны отдельные субъединицы канала. Г – анализ распределения интерфейсов связывания пептидов в каждом отдельном случае с конкретной областью Kv11.1. Д – карта электростатических потенциалов Kv11.1. Красным показаны области локальных максимумов отрицательного потенциала, синим – положительного. Стрелками обозначены направления градиентов потенциала в пространстве.

Список литературы:

1. Wang W., MacKinnon R. Cryo-EM Structure of the Open Human Ether-à-go-go-Related K<sup>+</sup> Channel hERG // *Cell*. 2017. № 3 (169). C. 422-430.
2. Jimenez-Vargas J. M., Restano-Cassulini R., Possani L. D. Interacting sites of scorpion toxin ErgTx1 with hERG1 K<sup>+</sup> channels // *Toxicon*. 2012. № 6 (59). C. 633-641.
3. Zavarzina I. I., Kuzmenkov A. I., Dobrokhotoy N. A., Maleeva E. E., Korolkova Y. V., Peigneur S., Tytgat J., Krylov N. A., Vassilevski A. A., Chugunov A. O. The scorpion toxin BeKm-1 blocks hERG cardiac potassium channels using an indispensable arginine residue // *FEBS Letters*. 2024. № 8 (598). C. 889-901.
4. Jain A., Stack O., Ghodrati S., Sanchez-Conde F. G., Ukachukwu C. U., Salwi S., Jimenez-Vazquez E. N., Jones D. K. KCNH2 encodes a nuclear-targeted polypeptide that mediates hERG1 channel gating and expression // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2023. № 3 (120). C. e2214700120.

### **Б39. РАЗРАБОТКА РЕПОРТЕРНЫХ РНК-КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА СОБЫТИЙ ТРАНСКРИПЦИОННОГО МУТАГЕНЕЗА**

Позднякова Е. Д.<sup>1,2</sup>, Кулишова Л. М.<sup>1</sup>, Жарков Д. О.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

**Ключевые слова:** Транскрипционный мутагенез, РНК-полимеразы, 8-оксогуанин

Генетический материал клетки постоянно подвергается действию экзогенных и эндогенных генотоксических агентов, что приводит к образованию повреждений ДНК. Во время транскрипции РНК-полимеразы, сталкиваясь с модифицированными азотистыми основаниями, могут включать нуклеотиды, не комплементарные исходной матрице. Этот процесс, известный как транскрипционный мутагенез, ведет к синтезу популяций идентичных мутантных транскриптов и, как следствие, к образованию aberrантных белков и нефункциональных РНК, что может нарушать жизнедеятельность клетки.

Существующие методы детекции событий ТМ, за исключением дорогостоящего глубокого секвенирования, применимы для изучения исключительно РНК-полимераз, синтезирующих матричные РНК, и основаны на анализе репортерных белков. Для исследования транскрипционного мутагенеза у РНК-полимераз, синтезирующих функциональные РНК (тРНК, рРНК, регуляторные РНК и др.) необходима разработка специальных репортерных систем на основе РНК.

Целью работы была разработка репортерных РНК-конструкций для анализа событий транскрипционного мутагенеза, вызванных наличием в ДНК остатков 8-оксо-7,8-дигидрогуанина (8-охоGua) – основного продукта окисления гуанина в клетках живых организмов.

В качестве основы для репортерной системы, позволяющей изучать транскрипционный мутагенез в условиях *in vitro*, была выбрана последовательность рибозима типа «головка молотка» из вироида латентной мозаичности персика. Замены некоторых из консервативных оснований в каталитическом ядре этого рибозима приводят к частичной или полной потере способности к саморасщеплению. В работе определена глубина реакции расщепления при заменах А>С в ключевых позициях. На основе неактивного рибозима была успешно разработана система для анализа транскрипционного мутагенеза *in vitro*, которая была апробирована для оценки точности синтеза РНК-полимеразы бактериофага Т7 на матрице, содержащей 8-охоGua.

Идет разработка репортерной системы для изучения функциональных РНК-полимераз *in vivo* на основе РНК-аптамеров типа Шпинат, способных специфично связывать флуоресцентные красители. Внесение точечных мутаций в последовательности аптамеров может отражаться на способности к флуоресценции, что служит репортерным сигналом для детекции ошибок синтеза РНК.

Полученные результаты закладывают основу для создания нового инструментария, позволяющего изучать точность транскрипции при транскрипционном мутагенезе у широкого спектра РНК-полимераз, ответственных за синтез некодирующих РНК, в различных условиях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-14-00285). Научный руководитель — канд. биол. наук Л. М. Кулишова

## **A23. ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ AMBR 250 ДЛЯ РАЗРАБОТКИ И МАСШТАБИРОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА**

Полянский Д.С.<sup>12\*</sup>, Рябова Е.И.<sup>13</sup>, Деркаев А.А.<sup>1</sup>, Старков Н.С.<sup>1</sup>, Кашапова И.С.<sup>1</sup>, Штейзель К.И.<sup>1</sup>, Щебляков Д.В.<sup>1</sup>, Карпов А.П.<sup>1</sup>, Есмагамбетов И.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Министерство Здравоохранения Российской Федерации, Москва

<sup>2</sup>МИРЭА — Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Москва

<sup>3</sup>Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина, Москва

\* preclanc@mail.ru

**Ключевые слова:** биотехнология, разработка и масштабирование, модифицированные однодоменные антитела

**Введение.** В течение последних лет моноклональные антитела часто используются для подавления распространения инфекции посредством прямой вируснейтрализующей активности. Однако, также перспективностью в борьбе с различными вирусами обладают однодоменные антитела, которые являются наименьшим функциональным форматом антител и представляют собой эффективную альтернативу классических моноклональных антител во многих аспектах [1-7]. Поскольку данные антитела имеют большой спрос, то необходимо постоянно совершенствовать технологию их получения. Целью данного исследования являлась разработка эффективной технологии культивирования клеток яичников китайского хомячка (СНО), стабильно продуцирующих модифицированные однодоменные антитела, с применением системы Ambr 250, а также подбор оптимальных параметров культивирования и масштабирование данной технологии на производстве.

**Результаты.** Для клона СНО-GamP2C5 были подобраны оптимальные параметры процесса культивирования: питательная среда ActiPro в комбинации с питательными добавками 7A и 7B, pH = 7.2, температура 37 °C с понижением до 33°C при достижении максимальной плотности, добавление глюкозы до 4 г/л, а также газовой стратегии поддерживающей уровень растворенного кислорода на уровне 40 % и подачей воздуха 4 мл/мин. При данных параметрах культура клеток СНО экспрессировала наибольшее количество целевого антитела (456 мкг/мл). После подбора оптимальных параметров культивирования для клеточной линии СНО-GamP2C5, было проведено культивирование в биореакторе с осевым типом перемешивания с рабочим объемом 200 л, выход целевого белка составил 564,4 мкг/мл.

После ряда экспериментов для клона СНО-GamD9.2-G2.3 были подобраны следующие параметры культивирования: питательная среда AGT Dynamis в комбинации с питательной добавкой Cell Boost 5, pH = 7.2, температура 37 °C, добавление глюкозы до 5 г/л, а также газовой стратегии, поддерживающей уровень растворенного кислорода на уровне 30 % и подачей воздуха 2 мл/мин. При данных параметрах культура клеток СНО экспрессировала наибольшее количество целевого антитела (186 мкг/мл). После подбора оптимальных параметров культивирования для клеточной СНО-GamD9.2-G2.3, было проведено культивирование в биореакторе с осевым типом перемешивания с рабочим объемом 200 л выход целевого продукта составил 180 мкг/мл.

**Выводы.** Для клона СНО-GamP2C5 и СНО-GamD9.2-G2.3 были подобраны оптимальные параметры процесса культивирования, которые позволяют получать

максимальный выход целевого антитела. Подобраны оптимальные питательные среды в комбинации с питательными добавками. С помощью системы минибиореакторов Ambr 250 проведена работа по оценке влияния изменения температуры во время культивирования на продуктивность целевого антитела. Кроме того, подобран pH питательной среды, который также влияет на культивирование данных клонов. Кроме того, проведена работа по подбору оптимальных параметров с учетом изменения типа перемешивания, а также внесения питательных добавок. Затем данная технология была успешно масштабирована на GMP производстве (Филиал «Медгамал»). После перехода в биореактор производственного масштаба (биореактор с осевым типом перемешивания) выход целевого антитела имел сопоставимые значения с лабораторным масштабом.

#### Список литературы

1. Favorskaya I.A., Shcheblyakov D.V., Esmagambetov I.B., Dolzhikova I.V., Alekseeva I.A., Korobkova A.I., Voronina D.V., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Kovyrshina A.V., et al. Single-Domain Antibodies Efficiently Neutralize SARS-CoV-2 Variants of Concern // *Front. Immunol.* - 2022. - №13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.822159>
2. Есмагамбетов И.Б., Щебляков Д.В., Егорова Д.А., Воронина О.Л., Деркаев А.А., Воронина Д.В., Попова О., Рябова Е.И., Щербинин Д.Н., Аксенова Е.И., Семенов А.Н., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Зубкова О.В., Тухватулин А.И., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Борисевич С.В., Гинцбург А.Л. Наноантитела – потенциальный терапевтический препарат против лихорадки Эбола // *Acta Naturae.* 2021. № 13(4). С. 53–63. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11487>
3. Derkaev A.A., Ryabova E.I., Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Godakova S.A., Vinogradova I.D., Noskov A.N., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. rAAV expressing recombinant neutralizing antibody for the botulinum neurotoxin type A prophylaxis // *Front. Microbiol.* - 2022. - №13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.960937>
4. Voronina D.V., Shcheblyakov D.V., Favorskaya I.A., Esmagambetov I.B., Dzharullaeva A.S., Tikhvatulin A.I., Zubkova O.V., Popova O., Kan V.Y., Bandelyuk A.S., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditskiy B.S., Gintsburg A.L. Cross-Reactive Fc-Fused Single-Domain Antibodies to Hemagglutinin Stem Region Protect Mice from Group 1 Influenza A Virus Infection // *Viruses.* - 2022. - №14(11). <https://doi.org/10.3390/v14112485>
5. Panova E.A., Kleymenov D.A., Shcheblyakov D.V., Bykonina E.N., Mazunina E.P., Dzharullaeva A.S., Zolotar A.N., Derkaev A.A., Esmagambetov I.B., Sorokin I.I., Usachev E.V., Noskov A.N., Ivanov I.A., Zatsepin T.S., Dmitriev S.E., Gushchin V.A., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A. // *Front. Immunol.* - 2023. - №14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1098302>
6. Godakova S.A., Noskov A.N., Vinogradova I.D., Ugriumova G.A., Solovyev A.I., Esmagambetov I.B., Tikhvatulin A.I., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Shcheblyakov D.V., Gintsburg A.L. Camelid VHHs Fused to Human Fc Fragments Provide Long Term Protection Against Botulinum Neurotoxin A in Mice // *Toxins (Basel).* - 2019. - №11(8). <https://doi.org/10.3390/toxins11080464>
7. Esmagambetov I.B., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Shcheblyakov D.V., Dolzhikova I.V., Favorskaya I.A., Grousova D.M., Dovgiy M.A., Prokofiev V.V., Gosudarev A.I., Byrikhina D.V., Zorkov I.D., Iliukhina A.A., Kovyrshina A.V., Shelkov A.Y., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. rAAV expressing recombinant antibody for emergency prevention and long-term prophylaxis of COVID-19. // *Front. Immunol.* - 2023. - №14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1129245>
8. Полянский Д.С., Рябова Е.И., Деркаев А.А., Старков Н.С., Кашапова И.С., Щебляков Д.В., Карпов А.П., Есмагамбетов И.Б. Разработка технологии культивирования клеточной линии, продуцирующей однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом

IgG1 человека. // Тонкие химические технологии. - 2024. - №19(3). - С. 240-257.  
<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-3-240-257>

## **Б40. ВКЛЮЧЕНИЕ ВАРИАНТНОГО ГИСТОНА H3.3 В СОСТАВ НУКЛЕОСОМ УСИЛИВАЕТ ИХ СВЯЗЫВАНИЕ С dCas9**

Рощина Е. А.<sup>1\*</sup>, Гераськина О.В., Феофанов А.В.

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

\*kate-5830@mail.ru\*

**Ключевые слова:** нуклеосома, вариантный гистон H3.3, dCas9, гРНК, РАМ-последовательность

Вариантные гистоны существенно влияют на архитектуру и динамику хроматина, формируя локальные эпигенетические контексты, определяющие доступность ДНК для белков-регуляторов. Среди них особое место занимает вариант H3.3, ассоциированный с активной транскрипцией и ремоделированием нуклеосом. Понимание того, как H3.3 влияет на связывание систем CRISPR/dCas с ДНК, имеет фундаментальное значение для разработки инструментов направленного воздействия на эпигеном.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния включения гистона H3.3 в состав нуклеосом на связывание с каталитически неактивным белком dCas9 в зависимости от положения целевой РАМ-последовательности и локализации флуоресцентных меток.

Для этого были собраны моонуклеосомы на основе позиционирующей последовательности 601, содержащие флуоресцентные пары Cy3/Cy5 в проксимальной, медиальной, дистальной и линкерной областях. Нуклеосомы, включающие вариант H3.3, сравнивались с нуклеосомами, содержащими канонический H3. Анализ проводили методами электрофоретического сдвига и spFRET-микроскопии в присутствии комплексов dCas9–гРНК, нацеленных на участки вблизи диады и входа ДНК в нуклеосому.

Полученные результаты показали, что включение H3.3 приводит к усилению связывания dCas9 с нуклеосомами независимо от положения мишени, однако интенсивность эффекта зависит от локализации флуоресцентной метки. Наиболее выраженные структурные перестройки наблюдались в линкерной и проксимальной областях, где происходило отворачивание ДНК от октамера, что свидетельствует о повышенной подвижности участков ДНК при присутствии H3.3.

Формирование тройного комплекса dCas9–гРНК–нуклеосома подтверждено как при нацеливании гРНК на область диады, так и при расположении РАМ-последовательности у входа ДНК в нуклеосому. Эти наблюдения согласуются с ранее описанными эффектами для нуклеосом с H2A.Z и подтверждают, что варианты гистонов повышают пластичность хроматиновой упаковки, облегчая взаимодействие CRISPR-систем с ДНК-мишенями.

Результаты работы расширяют понимание механизмов взаимодействия dCas9 с нуклеосомами в активном хроматиновом контексте и могут быть использованы для оптимизации CRISPR/dCas-технологий, направленных на эпигенетическую регуляцию без индукции разрывов ДНК.

### **Список литературы**

1. Разин С. В., Быстрицкий А. А. Хроматин: упакованный геном. Москва: Лаборатория знаний, 2025.
2. Zhang Y. et al. Structural basis for H3.3-mediated modulation of nucleosome accessibility. *Nature Communications*. 2024. Vol. 15. Article 54768. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-54768-z>

## А24. ТРАНСДЕРМАЛЬНАЯ ДОСТАВКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА

Рубальская К.С.<sup>1\*</sup>, Конкина В.А.<sup>1</sup>, Грибиниченко Т.Н.<sup>1</sup>

*1. Университет ИТМО*

*\*rubalskaia@itmo.ru*

**Ключевые слова:** наночастицы, хитозан, триполифосфат натрия, генипин

**Введение.** Полимерные наночастицы обладают рядом преимуществ при использовании в трансдермальной доставке биологически активных веществ по сравнению с другими системами: например, возможность таргетной доставки и пролонгированного высвобождения инкапсулированного вещества. Хитозан как нетоксичный, биосовместимый, биоразлагаемый и pH-чувствительный биополимер является одним из наиболее перспективных материалов для создания систем связывания и стабилизации активных веществ для их дальнейшей доставки к тканям.

**Основная часть.** Хитозан представляет собой поликатион, который, благодаря наличию аминогрупп в основной цепи, способен образовывать полиэлектролитные комплексы (ПЭК) с широким спектром полианионов, в частности с триполифосфатом натрия (ТРП) [1].

Для формирования наночастиц хитозан-ТРП был выбран метод ионного гелеобразования. Он основан на формировании ПЭК за счет электростатического притяжения между положительно заряженными аминогруппами хитозана и отрицательно заряженными фосфатными группами ТРП и подходит для формирования стабильных наночастиц со средним размером около 100 нм, что делает возможным их прохождение через кожный барьер [2]. Одним из первичных признаков успешного протекания процесса являлось появление опалесценции, которая указывает на формирование в растворе дисперсной фазы.

Улучшить биосовместимость наночастиц на основе хитозана возможно при использовании природных сшивающих агентов [3]. Так, генипин, обнаруживаемый в плодах гардении, способен к формированию ковалентных связей вследствие взаимодействия его альдегидной группы и аминогрупп хитозана.

**Вывод.** В ходе исследования было изучено, как такие параметры, как концентрация компонентов, значение pH и условия проведения процесса ионного гелеобразования, влияют на получаемые в результате частицы, а также проанализированы возможные природные альтернативы ТРП как сшивающему агенту.

Список литературы.

1. Cunli P. et al. Study on the relationship between crosslinking degree and properties of TPP crosslinked chitosan nanoparticles // Carbohydrate Polymers. 2020. Vol. 241, 116349.
2. Попова Э. В., Зорин И. М., Домнина Н. С., Новикова И. И., Краснобаева И. И.. Наночастицы хитозан-триполифосфат: синтез методом ионного гелеобразования, свойства и биологическая активность // Журнал общей химии. 2020. том 90, № 7, с. 1124-1132.
3. Indurkar A. et al. Plant based cross-linkers for tissue engineering applications // Journal of Biomaterials Applications. 2020. Vol. 36, № 1. P. 76-94.



## **A25. ЛИНИЯ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ CD44-GFP, ДЛЯ МОНИТОРИНГА ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ**

А.А. Сёмчина, А.Ю. Рыжкова\*, А.Г. Першина

*Центр биологических исследований и биоинженерии ЦНИЛ СибГМУ, Томск, Россия*

*\* alya.ryzhkova.2003@mail.ru*

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas9, рак молочной железы, CD44, биосенсор

Образование вторичных опухолей (метастазов) – основная причина высокой летальности многих типов раковых заболеваний [1]. Согласно современным представлениям, для того чтобы инициировать рост метастаза, раковая клетка должна перейти в состояние, подобное стволовой клетке, в результате дедифференцировки [1, 2]. Одним из маркеров такого перехода является экспрессия поверхностного маркера CD44 [3].

Целью исследования было создать линию клеток рака молочной железы человека T47D, транскрибирующих продукт гена *CD44* в виде единой мРНК с зеленым флуоресцентным белком (eGFP), но транслирующих CD44 и eGFP в форме отдельных белков.

Для получения генетически модифицированной линии клеток была использована система CRISPR/Cas9. Донорная плазмида была сконструирована С.П. Медведевым (ИЦИГ СО РАН, Новосибирск) и содержала последовательность, кодирующую зеленый флуоресцентный белок eGFP, ограниченную плечами гомологии к гену *CD44*, последовательность T2A-пептида между левым плечом гомологии и геном eGFP и ген устойчивости к антибиотику Neo<sup>r</sup>/Kan<sup>r</sup>, ограниченный с двух сторон lox- сайтами; sgRNA были подобраны к 18 экзону гена *CD44*. Эффективность ко-трансфекции клеток T47D с использованием Metafectene (Biotex, Германия), согласно данным проточной цитофлуориметрии, составила 4,30 % ± 0,06 %. После селекции клеток и отбора клонов, устойчивых к генетицину, успешное встраивание трансгена подтверждали с помощью ПЦР. Далее полученная поликлональная линия клеток была использована для получения моноклональной линии методом предельных разведений.

Полученная генетически модифицированная линия клеток рака молочной железы человека T47D, экспрессирующая продукт гена *CD44* в виде единой мРНК с eGFP и транслирующая белки CD44 и eGFP в форме отдельных белков, может быть использована при разработке противоопухолевых лекарств, предназначенных для лечения метастатической болезни за счет подавления процесса дедифференцировки раковых клеток [4]. Особенно актуально применение данной линии клеток при тестировании в системе «орган-на-чипе», так как процесс детектирования и подсчета флуоресцентных клеток может быть автоматизирован с применением машинного обучения для интеграции искусственного интеллекта в систему.

### **Список литературы**

1. Gerstberger S, Jiang Q, Ganesh K. Metastasis // Cell. 2023. Vol. 186, № 8. P. D1564-D1579.
2. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions // Cancer Discov. 2022. Vol. 12, № 1. P. D31-D46.
3. Xu H, Niu M, Yuan X, Wu K, Liu A. CD44 as a tumor biomarker and therapeutic target // Exp Hematol Oncol. 2020 Vol. 9, № 1. P. 36.
4. Nevskaya KV et al. Prevention of Metastasis by Suppression of Stemness Genes Using a Combination of microRNAs // J Med Chem. 2024. Vol. 67, № 7. P.D5591-D5602.

## **А26. ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ТРАНСФЕКЦИИ И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК НЕК293 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА**

Рябова Е. И.<sup>1\*</sup>, Деркаев А.А.<sup>1</sup>, Довгий М.А.<sup>1</sup>, Щебляков Д.В.<sup>1</sup>, Есмагамбетов И.Б.<sup>1</sup>

*1. ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России*

*\*ryabovaei96@gmail.com*

**Ключевые слова:** гAAV, НЕК293, полиэтиленмин (PEI), трансфекция

Сегодня, рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (гAAV) являются наиболее востребованными инструментами для создания препаратов генной терапии благодаря безопасности, низкой иммуногенности и трансдуцировать широкий спектр клеток и тканей [1]. Кроме того, гAAV могут быть использованы для создания средств пассивной генетической иммунизации, благодаря возможности доставки и длительной экспрессии генов нейтрализующих антител [2, 3].

Основной проблемой при получении и производстве препаратов гAAV является относительно низкий выход целевого продукта. На сегодняшний день, наиболее часто для получения гAAV применяют технологию транзientной трансфекции клеток НЕК293 трёхплазмидной системой. При использовании данной технологии, важной задачей является выбор оптимальной питательной среды для трансфекции и культивирования, оптимизация параметров процесса культивирования и трансфекции (соотношения плазмид и трансфецирующего агента, плотность клеточной культуры на момент трансфекции).

Целью данной работы являлась оптимизация параметров трансфекции и культивирования клеток НЕК293 в процессе получения препаратов гAAV для повышения продуктивности.

Работа выполнялась в процессе получения препарата гAAV-DJ-B11-Fc, несущего ген модифицированного однодоменного антитела, нейтрализующего ботулинический нейротоксин типа А. Для достижения цели проведён подбор молярных соотношений трёх плазмид рAAV-DJ-B11-Fc, рAAV-DJ Vector, рHelper, описанных ранее [2], количества трансфекционного агента (PEI) и времени инкубации клеток после трансфекции. Количественную оценку продукции гAAV проводили методом qPCR, как описано ранее [2, 3].

Культивирование и трансфекцию клеток НЕК293 проводили в суспензионных условиях при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> и плотности 1×10<sup>6</sup> кл/мл. В ходе подбора оптимальной питательной среды, сравнивали BalanCD НЕК293 (Irvine Scientific), Celer-S101 (Bioengine) и Transpro CD 01 plus (Duoning). Наиболее оптимальные эффективность трансфекции, плотность и жизнеспособность клеток наблюдались при использовании питательной среды BalanCD НЕК293, которая использовалась в дальнейших экспериментах.

В ходе оптимизации трансфекции установлено, что наиболее высокий титр гAAV-DJ-B11-Fc наблюдался при соотношении плазмиды 1/1/1 и составил 4,6×10<sup>9</sup> гк на мл клеточной суспензии, при соотношении ДНК:PEI 1:3,5. Другие комбинации соотношения плазмид – 1/0,5/1, 1/1/1,5, 1/1/2, 1/0,5/2, 1/2/1 и 2/1/1 – демонстрировали более низкую продуктивность (0,8–3,0×10<sup>9</sup> гк/мл). Изменение соотношений ДНК:PEI до 1:3 или 1:4 снижало выход на 15–25 %, а при 1:5 — почти вдвое. Кинетика накопления гAAV-DJ-B11-Fc показала, что к 24 ч после трансфекции, титр составлял 0,2×10<sup>9</sup> гк/мл, к 48 ч — 6,1×10<sup>9</sup> гк/мл, достигая максимума 7,3×10<sup>9</sup> гк/мл на 72 ч. При дальнейшем культивировании наблюдалось постепенное снижение титра гAAV-DJ-B11-Fc: до 6,7×10<sup>9</sup> гк/мл на 96 ч и 5,3×10<sup>9</sup> гк/мл на 120 ч.

Полученные результаты подтверждают, что оптимальный подбор молярных соотношений плазмид, количества трансфекционного агента и времени культивирования трансфицированных клеток, позволяют существенно повысить продуктивность процесса получения препаратов rAAV.

#### Список литературы

1. Ronzitti, G. Human immune responses to adeno-associated virus (AAV) vectors / G. Ronzitti, D. A. Gross, F. Mingozzi // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11 – P. 670.
2. Derkaev, A. A. rAAV expressing recombinant neutralizing antibody for the botulinum neurotoxin type A prophylaxis / A. A. Derkaev, E. I. Ryabova, I. B. Esmagambetov, D. V. Shcheblyakov [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13.
3. Esmagambetov, I. B. rAAV expressing recombinant antibody for emergency prevention and long-term prophylaxis of COVID-19 / I. B. Esmagambetov, E. I. Ryabova, A. A. Derkaev, D. V. Shcheblyakov [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14.

#### Б41. ИССЛЕДОВАНИЕ АМИЛОИДНОЙ АГРЕГАЦИИ БЕЛКА hSAA, СВЯЗАННОГО С РАЗВИТИЕМ ВТОРИЧНОГО АМИЛОИДОЗА

Рябова Н. А.<sup>1\*</sup>, Глухов А. С.<sup>1</sup>, Марченков В. В.<sup>1</sup>, Лаптева Ю. С.<sup>2</sup>, Катина Н. С.<sup>3</sup>

1. *Институт Белка РАН, г. Пущино, Московская обл.*

2. *Институт Биологического Приборостроения РАН, г. Пущино, Московская обл.*

3. *Филиал Института Биоорганической Химии РАН, г. Пущино, Московская обл.*

\*ryabova@phys.protres.ru

**Ключевые слова:** амилоиды, hSAA, электронная микроскопия

Образование фибрилл сывороточного амилоидного белка А человека (hSAA) приводит к развитию вторичных амилоидозов. К настоящему времени большинство исследований агрегации SAA выполнено на модели белка мыши или фрагментов белка hSAA. При этом агрегация полноразмерного белка человека остается практически неизученной.

В данной работе было проведено исследование амилоидной агрегации этого белка и показано, что hSAA способен к формированию амилоидных фибрилл разной морфологии в зависимости от pH раствора. Результаты электронной микроскопии свидетельствуют о том, что при pH 8,5 наблюдается образование извитых, тонких фибрилл (Рис. 1А). В отличие от этого при pH 7,8 белок hSAA формирует протяженные амилоиды длиной более 1 мкм, для которых характерна латеральная ассоциация протофиламентов (Рис. 1Б). При этом согласно данным инфракрасной спектроскопии, содержание кросс-β-структуры одинаково у двух типов амилоидных фибрилл и примерно равно 43%.

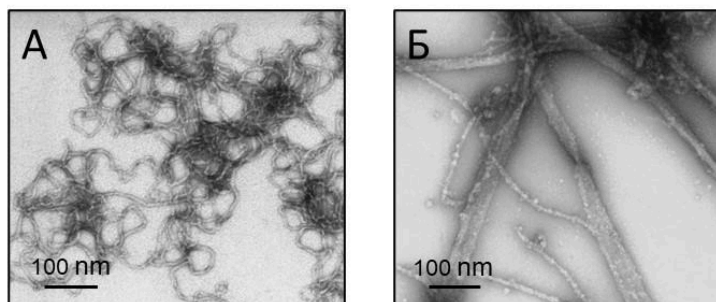


Рисунок 1. Фотографии амилоидных фибрилл hSAA, образуемых при pH 8,5 (А) и pH 7,8 (Б). Просвечивающая электронная микроскопия, негативное контрастирование.

Кинетика агрегации при различных концентрациях hSAA и двух значениях pH была исследована с помощью метода тиофлавиновой флуоресценции. Показано, что скорость амилоидообразования при pH 7,8 линейно возрастает с увеличением концентрации hSAA, что характерно для процесса ассоциации частиц. В отличие от этого при pH 8,5 скорость агрегации не зависит от концентрации белка. Это позволяет предположить, что видимая и самая медленная стадия агрегации при pH 8,5 отражает структурные перестройки в агрегатах, связанные с формированием кросс-β-структуры.

Таким образом, результаты работы позволяют обнаружить полиморфизм амилоидов и различие в кинетических механизмах агрегации hSAA в диапазоне физиологических условий. Полученные данные могут быть полезны для поиска подходов к направленному изменению агрегации hSAA с целью терапии заболеваний, вызванных формированием амилоидных фибрилл в тканях человека.

## **Б42. ИНТЕГРАТИВНЫЙ АНАЛИЗ СЕТЕЙ КОЭКСПРЕССИИ MRNA–MIRNA–LNCRNA ПО ДАННЫМ RNA-SEQ**

Савочкин А. В.<sup>1\*</sup>, Кухарский М.С.<sup>1</sup>

*1. Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова*

*\*andrey.20041@mail.ru*

**Ключевые слова:** биоинформатика, биоинженерия, молекулярная биология, сети ко-экспрессии

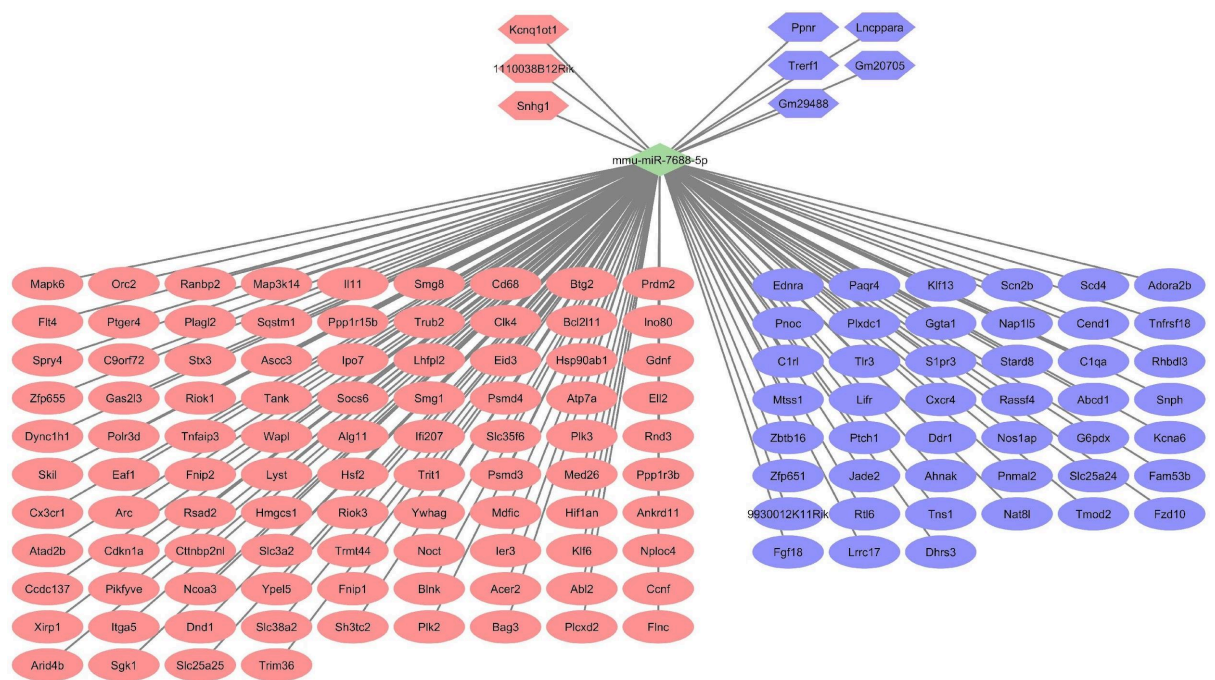
**Введение.** Регуляция экспрессии генов в клетке осуществляется множеством взаимосвязанных механизмов. Особое внимание в последние годы уделяется некодирующим РНК lncRNA, которые формируют сложные сети взаимодействий с мРНК и способны существенно влиять на клеточные процессы. Изучение этих сетей в условиях стрессового воздействия позволяет выявить ключевые регуляторные узлы, потенциально вовлечённые в патологические механизмы.

**Цель исследования.** Оценить вклад lncRNA в регуляцию экспрессии генов на основе интегративного анализа сетей коэкспрессии mRNA–miRNA–lncRNA в клеточной модели нейробластомы SH-SY.

**Материалы и методы.** Клетки SH-SY подвергались воздействию ингибитора протеасомы MG132 (стресс) и DMSO 0.1% (контроль). Из тотальной РНК получали библиотеки и выполняли секвенирование (RNA-seq). Дифференциальная экспрессия анализировалась с использованием пакета DESeq2. Для построения сети взаимодействий были отобраны DE-гены, а поиск таргетов miRNA проводился по базам данных для mRNA и lncRNA. Функциональная аннотация выполнена с применением Gene Ontology (BP – Biological Process, CC – Cellular Component, MF – Molecular Function).

**Результаты.** Построенная сеть показала центральную роль mmi-miR-7688-5p, регулирующего широкий спектр mRNA и несколько lncRNA. Функциональный анализ выявил обогащение категорий, связанных с клеточными процессами, регуляцией метаболизма, биосинтезом, ответом на стресс и сигналингом. При отборе значащих функций отбирались только те, в которых генов было более 30 и  $pvalue < 0,05$ . По компонентам клетки наибольшая представленность отмечена в цитоплазме, ядре и мембранных структурах, что отражает комплексное вовлечение внутриклеточных сигнальных каскадов. Среди молекулярных функций доминировало protein binding, что подтверждает активацию белок-белковых взаимодействий при нарушении деградации белков.

**Выводы.** Интегративный анализ выявил ключевые ncRNA, формирующие регуляторные оси в условиях протеотоксического стресса. Полученные данные подтверждают участие ncRNA в поддержании клеточного гомеостаза и позволяют рассматривать их как потенциальные мишени для изучения механизмов нейродегенеративных заболеваний.



## **A27. МЯГКИЙ МУЛЬТИМОДАЛЬНЫЙ ИМПЛАНТ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА**

Саин А.Ю.<sup>1\*</sup>, Абдурашитов А.С.<sup>1,2</sup>, Прошин П.И.<sup>2</sup>, Статник Е.С.<sup>3</sup>, Корсунский А.М.<sup>3</sup>, Салимон А.И.<sup>3</sup>, Синдеева О.А.<sup>1</sup>, Мусиенко П.Е.<sup>2,4</sup>, Сухоруков Г.Б.<sup>1,2</sup>

1. Центр нейробиологии и нейрореабилитации им. Владимира Зельмана, Сколковский институт науки и технологий, Большой бульвар, д. 30 ст. 1, 121205, Москва, Россия

2. Центр «Life Improvement by Future Technologies», Большой бульвар, д. 30 ст. 1, 121205, Москва, Россия

3. Центр системного проектирования, Сколковский институт науки и технологий, Большой бульвар, д. 30 ст. 1, 121205, Москва, Россия

4. Институт трансляционной медицины, Санкт-Петербургский Государственный Университет, Университетская набережная, д. 7-9, 199034, Санкт-Петербург, Россия  
\*Alexandra.Sain@skoltech.ru.

**Ключевые слова:** биотехнология, травма спинного мозга, биоматериалы

Травма спинного мозга (ТСМ) это состояние, затрагивающее более 15 миллионов человек (по данным 2021 года). Помимо изначальной травмы характеризуется набором патологических процессов, среди которых нейродегенерация, воспаление и глиальное рубцевание играют важную роль в структурном и функциональном восстановлении. На начальных этапах воспаление важно для очищения травмированной зоны и погашения инфекции. Однако длительное течение воспаления сопровождается эксайтотоксичностью, окислительным стрессом и гибелью нейрональной ткани, приводя к повреждению неврологических и когнитивных функций. Глиальный рубец ограничивает поврежденную область, контролируя распространение воспаления и других патологических процессов, в то же время сдерживая рост новых клеток и структурное восстановление [1,2].

Наиболее распространенной методикой терапии является инфузия или инъекционное введение лекарственных веществ, что требует ежедневных манипуляций. В то время как применение импланта может обеспечить долгосрочную стабильную локальную терапию с заранее подстроенной нужным образом динамикой. Предложенный имплант высвобождает три препарата с динамикой, соответствующей трем патологическим процессам - воспалению, нейродегенерации и глиального рубцевания. Синхронизация динамики высвобождения препарата с патологическим процессом, на который он призван воздействовать, может улучшить результаты терапии [3,4,5].

Полученный имплант состоит из четырех слоев и включает три препарата - метилпреднизолон (противовоспалительное), рилузол (нейропротектор), дефероксамин (противофиброзное). Суммарная толщина структуры  $227.07 \pm 30.18$  микрон, что важно для субдуральной имплантации. Механические свойства: максимальное напряжение растяжения -  $1.11 \pm 0.10$  МПа, модуль Юнга -  $49.07 \pm 10.06$  КПа. Динамика высвобождения трех препаратов соответствует терапевтическим окнам, взятым в качестве целевых показателей. Результаты *in vitro* экспериментов на культурах мышечной нейробластомы, фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток доказали безопасность и эффективность полученной структуры.

Разработанная структура соответствует требованиям жесткости, эластичности и выносливости к циклическим деформациям, которые накладывает субдуральное расположение и контакт с нейрональной тканью. Эксперименты доказали эффективность и безопасность конструкции, а также способность обеспечивать долгосрочную терапию, синхронизированную с процессами вторичной травмы спинного мозга.

#### Список литературы

1. Lotti F., Ranieri F., Vadalà G., Zollo L. и др. Invasive Intraneural Interfaces: Foreign Body Reaction Issues // *Frontiers in Neuroscience*. 2017. Т. 11. № 497.
2. Gulino M., Kim D., Pané S., Santos S. D. и др. Tissue Response to Neural Implants: The Use of Model Systems Toward New Design Solutions of Implantable Microelectrodes // *Frontiers in Neuroscience*. 2019. Т. 13. № 689.
3. Rahmanian M., Ghahremani A., Kesharwani P., Oroojalian F. и др. Nanomedicine innovations in spinal cord injury management: bridging the gap // *Environmental Research*. 2023. Т. 235. № 116563.
4. Ziemba A. M., Gilbert R. J. Biomaterials for Local, Controlled Drug Delivery to the Injured Spinal Cord // *Frontiers in Pharmacology*. 2017. Т. 8. № 245.
5. Collazos-Castro J. Handbook of Innovations in Central Nervous System Regenerative Medicine. 2020. С. 259–289.



### **Б43. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО WGR-ДОМЕНА PARP2 ЧЕЛОВЕКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ВЛИЯНИЯ НА СТРУКТУРУ НУКЛЕОСОМ**

Саулина А. А.<sup>1,2\*</sup>, Малюченко Н. В.<sup>1</sup>, Гераськина О. В.<sup>1</sup>, Коровина А. Н.<sup>1</sup>, Феофанов А. В.<sup>1</sup>, Студитский В. М.<sup>3</sup>.

1. Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва

2. Институт биологии гена РАН, Москва

3. Центр исследования рака Фокс Чейз, Филадельфия, США

\**lys-alex-bio-msu@yandex.ru*

**Ключевые слова:** PARP, нуклеосома, хроматин, FRET

PARP2 – ядерный фермент из суперсемейства белков PARP (поли(АДФ-рибоза)-полимераз). Катализируемая PARP2 реакция - поли(АДФ-рибозилирование) - является посттрансляционной модификацией белков гомополимерной цепью из АДФ-рибозы. Поли(АДФ-рибозилирование) участвует в регуляции различных процессов в жизни клетки и всего организма: транскрипции, репарации ДНК, пролиферации клеток. Однако в основе данной работы лежит изучение другого эффекта PARP2. Нами было показано, что PARP2 способен менять структуру нуклеосом в присутствии ионов  $Zn^{2+}$  [1]. Было выдвинуто предположение, что ключевую роль в этом процессе может играть WGR-домен, ответственный за связывание PARP2 с ДНК и регулирующий его каталитическую активность.

Цель работы – получить рекомбинантный WGR-домен PARP2 человека (далее - WGR hPARP2) и исследовать его способность связываться с нуклеосомами и менять их структуру.

Ген WGR hPARP2 был получен методом ПЦР на основе гена полноразмерного hPARP2 и клонирован в плазмиду *E. coli* pET-15b-TEV. Плазмиды с геном WGR hPARP2 были трансформированы в электрокомпетентные клетки *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS. Белок был индуцирован добавлением IPTG, после чего был очищен в несколько этапов: 1) металл-аффинная хроматография с использованием колонки  $Ni^{2+}$ -сефароза; 2) аффинная хроматография с использованием гепариновой колонки; 3) финальная очистка WGR hPARP2 методом гель-фильтрации на колонке с сефакирилом. Взаимодействие полученного белка WGR hPARP2 с нуклеосомами было исследовано с помощью двух различных методов. Связывание WGR hPARP2 с нуклеосомами изучали методом визуализации на агарозных шариках с иммобилизованным  $Ni^{2+}$ : WGR hPARP2 присоединялся гексагистиридиновым тагом к шарикам, после чего в систему добавляли флуоресцентно меченые нуклеосомы и детектировали их флуоресценцию. Данный метод был разработан нами специально для изучения WGR PARP2, т.к. комплексы WGR с нуклеосомами нестабильны в геле. Влияние домена WGR hPARP2 на структуру нуклеосом было изучено с помощью FRET-микроскопии одиночных частиц с использованием флуоресцентно меченых нуклеосом.

Исследования показали, что WGR PARP2 способен связываться с нуклеосомами и в присутствии ионов  $Zn^{2+}$  оказывает аналогичное влияние на структуру нуклеосом, как и полноразмерный PARP2. Это может свидетельствовать о том, что WGR-домен PARP2 играет важную роль в связывании не только ДНК, но и целой нуклеосомы. Он также участвует в связывании ионов  $Zn^{2+}$  и отвечает за  $Zn^{2+}$ -зависимое изменение структуры нуклеосом. Исследование проводилось при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-30003).

#### **Список литературы**

1. Maluchenko et al. Poly(ADP-ribose)polymerase 2 is zinc-dependent enzyme and nucleosome reorganizer // Cellular and Molecular Life Sciences. 2025. Vol. 82, №2 67.

## A28. МАЛ ДА УДАЛ: НАНОГАЛОАРХЕЯ КАК ВАЖНЫЙ КОМПОНЕНТ ЭКСТРЕМАЛЬНО ГАЛОФИЛЬНОЙ АССОЦИАЦИИ ПОЛИСАХАРИДОЛИТИКОВ.

Селиванова Е. А.<sup>1\*</sup>, Якимов М. М.<sup>2</sup>

1. Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (Оренбург, Россия)

2. Институт полярных наук Национального совета исследований Италии (Мессина, Италия)

\*selivanova-81@mail.ru.

**Ключевые слова:** наногалоархеи, деградация гемицеллюлоз, высокая соленость

Ксиланы – основные структурные гетерополисахариды растений, которые могут составлять до 30% от сухого веса растений, как травянистых, так и лиственных, являясь основным резервуаром восстановленного углерода в окружающей среде Земли. В гиперсоленых рассолах биodeградация трудно разлагаемых растительных полисахаридов может быть подавлена стрессовыми условиями высокой солености для большинства групп микроорганизмов, что определяет важность метаболических возможностей экстремальных галофилов в их разложении.

Филум *Nanohaloarchaeota*, включающий наноразмерных архей, является характерным компонентом галофильных сообществ по всему миру (La Cono et al., 2024). Функция наногалоархей остается загадочной, так как, являясь облигатными симбионтами и обладая редуцированными геномами и скудными метаболическими путями, они не поддаются культивированию в отсутствие клеток хозяина. Однако несколько видов наногалоархей удалось культивировать в составе ассоциаций, использующих в качестве субстрата трудно разлагаемые полисахариды (La Cono et al., 2020).

Целью данного исследования было определить таксономическую принадлежность и функциональную роль компонентов экстремально галофильного ксиланолитического консорциума архей.

Микробная ассоциация была выделена из Соль-Илецких озер с соленостью близкой к насыщению при использовании ксилана как единственного источника энергии и субстрата для роста. С использованием микроскопии, культивирования и мультиомиксного подхода охарактеризован новый вид *Ca. Nanohalococcus occultus*, являющийся единственным представителем нового предложенного класса *Ca. Nanohalococcia*. Показано, что в трехкомпонентном консорциуме наногалоархей существуют как эктосимбионты архей *Haloferax volcanii*, которые, в свою очередь, утилизируют олигосахариды, образующиеся при гидролизе ксилана археями *Halorhabdus sp.* (Reva et al., 2023). Были проанализированы метаболические возможности и особенности экофизиологии нового культивируемого вида наногалоархей. В результате было продемонстрировано, что, несмотря на рудиментарные катаболические способности и отсутствие минимального набора ферментов, необходимого для биосинтеза нуклеотидов, аминокислот, липидов, витаминов и кофакторов, наногалоархеи *Ca. Nanohalococcus occultus* обладают многочисленными уникальными адаптивными механизмами, необходимыми для их эктосимбиотической активности. Доказано, что эктосимбионтные наногалоархеи являются активным экофизиологическим компонентом экстремально галофильного сообщества, разлагающего ксилан при высокой солености (Reva et al., 2023; La Cono et al., 2023). В эксперименте показано, что наногалоархеи *Ca. Nanohalococcus occultus* ускоряют деградацию ксилана в консорциуме архей. При этом наногалоархеи *Ca. Nanohalococcus occultus* осуществляют гликолиз, тогда как другие симбионты

продуцируют ксиланазы и обеспечивают необходимый синтез. С использованием СЭМ было продемонстрировано образование гетероклеточных биопленок, связанных между собой клетками наногалоархей. С использованием транскриптомного анализа показано, что *Ca. Nanohalococcus occultus* влияет на метаболизм всех членов консорциума, хотя нуждается только в «хозяине», *Haloferax volcanii*, для размножения (Reva et al., 2025).

Трехкомпонентный консорциум, представленный ксиланолитическими галоархеями рода *Halorhabdus*, наногалоархеями *Ca. Nanohalococcus occultus* и их «хозяевами» *Haloferax volcanii*, которые утилизируют олигосахариды, образующиеся при гидролизе ксилана *Halorhabdus*, является перспективным для биodeградации этого компонента древесины в условиях высокой солености.

#### Список литературы

1. La Cono V. et al. Unique Features of Extremely Halophilic Microbiota Inhabiting Solar Saltworks Fields of Vietnam // *Microorganisms*. 2024. Vol. 12. 1975.
2. La Cono V. et al. Symbiosis between nanohaloarchaeon and haloarchaeon is based on utilization of different polysaccharides // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020. Vol. 117. №. 33. P. 20223-20234.
3. Reva O. et al. Functional diversity of nanohaloarchaea within xylan-degrading consortia // *Frontiers in Microbiology*. 2023. Vol. 14. 1182464.
4. La Cono V. et al. Nanohaloarchaea as beneficiaries of xylan degradation by haloarchaea // *Microbial Biotechnology*. 2023. Vol. 16. P. 1803–1822.
5. Reva O.N. et al. DPANN symbiont of *Haloferax volcanii* accelerates xylan degradation by the non-host haloarchaeon *Halorhabdus* sp. // *Iscience*. 2025, Vol. 28. № 2. 111749.

#### Б44. АНАЛИЗ СТЕХИОМЕТРИИ C-RING АТФ-СИНТАЗ ТЕРМОФИЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Семенов М.А.<sup>1</sup>, Минаева А.В.<sup>1</sup>, Осипов С.Д.<sup>1</sup>, Камалиева Л.А.<sup>1</sup>, Власов А.В.<sup>1,2</sup>

1. Центр исследования молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, МФТИ, Долгопрудный, Россия

2. Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

**Ключевые слова:** АТФ-синтаза, стехиометрия, термофильность

АТФ-синтаза - белковый комплекс, который синтезирует аденозинтрифосфат (АТФ), универсальный источник энергии для всех биохимических процессов, протекающих в живых системах [1] [2]. Для синтеза АТФ АТФ-синтаза использует градиент химического потенциала протонов по разные стороны мембраны, в которую она встроена. Этот комплекс присутствует в большинстве живых организмов, однако в разных таксономических группах его строение отличается. АТФ-синтазы состоят из мембранного и растворимого доменов. Мембранная часть содержит олигомерное роторное кольцо (c-ring), стехиометрия таких колец существенно различается между группами организмов. Стехиометрия c-ring является ключевым биоэнергетическим параметром АТФ-синтазы, так как она определяет соотношение между количеством синтезированных молекул АТФ и прошедших протонов. Экспериментально исследованы комплексы со стехиометрией от 8 до 17 (кроме 16).

Ранее был разработан алгоритм, основанный на AlphaFold, предсказывающий стехиометрию c-ring по его аминокислотной последовательности [3]. Этот алгоритм позволил обнаружить ряд организмов, чьи c-ring, предположительно, обладают необычной стехиометрией (> 17).

Термофильные организмы представляют большой научный интерес из-за молекулярных механизмов, позволяющих им приспосабливаться к жестким внешним условиям. Целью работы являлось изучение возможной корреляции между стехиометрией c-ring и способностью организма существовать в условиях температур. Мы использовали базу данных термофильных организмов ThermoBase [4] и семейство белков ATP synthase subunit c из базы данных InterPro. Мы выбрали те белки из этого семейства, которые принадлежат термофильным организмам. С помощью программы CD-HIT была проведена кластеризация аминокислотных последовательностей этих c-ring. С помощью упомянутого выше алгоритма для представителей каждого кластера была определена предполагаемая стехиометрия. Были проанализированы получившиеся значения стехиометрии для представителей разных кластеров, а также зависимость стехиометрии от отдельных параметров, таких как оптимальная температура существования, среда обитания, тип питания.

##### Список литературы

1. Kühlbrandt W. Structure and mechanisms of F-type ATP synthases //Annual review of biochemistry. – 2019. – Т. 88. – №. 1. – С. 515-549.
2. Vlasov A. V. et al. ATP synthase FOF1 structure, function, and structure-based drug design //Cellular and Molecular Life Sciences. – 2022. – Т. 79. – №. 3. – С. 179.
3. Osipov S. D. et al. High-Throughput Evaluation of Natural Diversity of F-Type ATP Synthase Rotor Ring Stoichiometries //Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 2025.
4. DiGiacomo, J., McKay, C. and Davila, A. ThermoBase: A database of the phylogeny and physiology of thermophilic and hyperthermophilic organisms. – 2022. – *PLoS One*. –17(5), p.e0268253.

## **Б45. СОЗДАНИЕ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАЗЫ SARS-COV-2 3CLPRO *IN VITRO***

Сергеевцева М.Б.

Московский физико-технический институт

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи

*mb\_sergeevtseva@mail.ru*

**Ключевые слова:** 3CLpro, ингибиторы, SARS-CoV-2, тест-система.

**Актуальность.** Для создания этиотропного лекарственного препарата против COVID-19, вызываемого SARS-CoV-2, необходимо было разработать надежную и простую тест-систему для оценки ингибирующей способности низкомолекулярных соединений в отношении основной протеазы (3CLpro) SARS-CoV-2. Модельная тест-система на основе 3CLpro и белка-мишени, несущего сайт расщепления 3CLpro, позволила проводить лабораторные исследования новых ингибиторов 3CLpro в условиях первого уровня биологической безопасности.

**Материалы и методы.** Для получения рекомбинантных фермента 3CLpro и белка-мишени, несущего сайт расщепления 3CLpro, были созданы генетические конструкции, оптимизированные под экспрессию в штаммах *Escherichia coli*. Очистка белковых продуктов после выделения из клеток *Escherichia coli* проводилась методом металл-хелатной хроматографии. Для проведения экспериментов по расщеплению протеазой 3CLpro белка-мишени были подобраны и оптимизированы условия реакции, включая концентрации фермента и субстрата, температуру, буферную систему и концентрацию NaCl. Визуализация результатов работы протеазы 3CLpro проводилась с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Тест-система была проверена на способность к оценке ингибирующего воздействия низкомолекулярных соединений на 3CLpro на модели противовирусного препарата, разработанного компанией Pfizer, перорально активного ингибитора 3CLpro Нирматрелвира, после чего на тест-системе был проверен новый ингибитор 3CLpro PH2.

**Результаты и обсуждение.** Разработанная модельная тест-система на основе 3CLpro SARS-CoV-2 и белка-мишени позволяет быстро и не трудозатратно проводить оценку ингибирующего эффекта и, как следствие, первичный скрининг новых ингибиторов протеазы 3CLpro. Данные, полученные с помощью тест-системы *in vitro*, коррелируют с исследованиями, проведенными *in vivo* на модельных животных, что свидетельствует о её надежности и эффективности. Переход к доклиническим испытаниям новых низкомолекулярных соединений с потенциальной ингибирующей способностью в отношении 3CLpro может быть значительно ускорен за счёт использования созданной тест-системы, что облегчает и продвигает исследования по разработке отечественного этиотропного лекарственного препарата против COVID-19.

### **Список литературы**

1. Hu Q. et al. The SARS-CoV-2 main protease (M<sup>pro</sup>): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19 // MedComm (2020). 2022. Vol. 14. № 3. P. 27.
2. Zagórska A. et al. Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease (M<sup>pro</sup>) as Anti-Coronavirus Agents // Biomolecules. 2024. Vol. 14. P. 30.

## А29. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОЛЛАГЕНА МЕДУЗ АЗОВСКОГО МОРЯ

Серeda A.A..<sup>1\*</sup>, Гордеева Ю.П.<sup>1</sup>, Головин С.Н.<sup>1</sup>

1. Донской государственный технический университет

\*alina.sereda2001@mail.ru

**Ключевые слова:** медузы, коллаген, биоинженерия

Наблюдаемый значительный рост популяции медуз в Азовском море [1] актуализировал проблему их промышленной добычи и поиска путей применения. Массовые скопления медуз приводят к деградации экосистемы: снижению концентрации растворенного кислорода и сокращению кормовой базы ценных промысловых рыб. По рекомендации Министерства сельского хозяйства в бассейне Азовского моря необходимо ежегодно отлавливать более 900 тысяч тонн медуз [2]. Одним из вариантов использования медуз Азовского моря является добыча коллагена, являющегося альтернативой традиционным видам, получаемым из кожи, сухожилий и хрящей животных [3]. Сфера применения продуктов из медуз обширна: от компонентов косметических средств и хирургических имплантатов для замещения дефектов мягких тканей до матриц в клеточных технологиях и тканевой инженерии [4]. Актуальность поиска альтернативных животному источников коллагена подкрепляет также риск передачи прионных и вирусных инфекций через коллаген животного происхождения, а также существующие религиозные ограничения на использование животного коллагена.

Нами были получены образцы коллагена медуз *Rhizostoma pulmo* и изучены его биологические свойства: цитотоксичность, биомиметичность и биосовместимость.

Изучение цитотоксичности коллагена медуз *Rhizostoma pulmo* проводилось на культуре клеток нормальных фибробластов человека MRC5 при помощи МТТ-теста. В результате исследования не было выявлено значительной разницы между образцами, содержащими раствор коллагена медуз *Rhizostoma pulmo* и контрольными образцом через 72 часа культивирования. Данное исследование показывает, что коллаген медуз *Rhizostoma pulmo* обладает цитосовместимостью и потенциально может быть использован в качестве матрикса для нормальных фибробластов человека и биомедицинских изделиях.

Для оценки биомиметичности и биосовместимости были получены стерильные лиофилизированные скаффолды из коллагена медуз. На скаффолдах в течение 5 суток были культивированы фибробласты человека, после чего проведена коллоидальная лазерная сканирующая микроскопия фрагментов скаффолдов. Данные микроскопии показывают, что в течение 5 суток культивирования фибробластов на поверхности коллагенового скаффолда морфология клеток оставалась типичной, фибробласты сохранили мезенхимный фенотип. Клетки адгезировались к материалу скаффолда и проявляли признаки активного деления. На 5-е сутки фибробласты успешно колонизировали весь скаффолд, сформировав аналог соединительной ткани. Таким образом, скаффолды из коллагена медуз обеспечивают условия для деления и колонизации нормальных клеток человека, что соответствует биомиметичности коллагена I типа, являющегося основным компонентом внеклеточного матрикса как в нормальных, так и в опухолевых тканях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-75-10137.

Список литературы

1. Развитие популяций сцифоидных медуз *Rhizostoma pulmo* и *Aurelia aurita* в Азовском море / З. А. Мирзоян, М. Л. Мартынюк, Д. В. Хренкин, Д. Ф. Афанасьев // Водные биоресурсы и среда обитания. – 2019. – Т. 2, № 2. – С. 27-35.
2. Рекомендованные объемы добычи (вылова) водных биологических ресурсов в 2025 году / [Электронный ресурс] // Азово-Черноморское территориальное управление Росрыболовства России: [сайт]. — URL: [clck.ru/3GRDvC](http://clck.ru/3GRDvC) (дата обращения: 08.09.2025).
3. Noorzai S. et al. Collagen extraction from various waste bovine hide sources //Waste and Biomass Valorization. – 2020. – Т. 11. – №. 11. – С. 5687-5698.
4. Coppola D. et al. Marine collagen from alternative and sustainable sources: Extraction, processing and applications //Marine drugs. – 2020. – Т. 18. – №. 4. – С. 214.

### А30. СМАЧИВАЕМОСТЬ ЭЛЕКТРОФОРМОВАННЫХ МЕМБРАН ИЗ СМЕСЕЙ ПОЛИЭФИРОВ С АЛЬБУМИНОМ

Сидорова А.Е.<sup>1\*</sup>, Рамонова А.А.<sup>1</sup>, Бонарцев А.П.<sup>1</sup>, Войнова В.В.<sup>1</sup>, Багров Д.В.<sup>1</sup>

1- Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова

\* sidorova.anastasiya.2003@mail.ru

**Ключевые слова:** биосовместимые полиэфиры, электроформованные мембраны, смачиваемость.

Биосовместимые полиэфиры — это группа полиэфиров которые могут безопасно взаимодействовать с биологическими системами (клетками и тканями). На их основе могут быть изготовлены различные смеси и композиты, и это позволяет существенно расширить спектр их свойств. Например, для преодоления низкой гидрофобности, характерной для многих полиэфиров, можно изготавливать смеси на их основе, содержащие гидрофильные компоненты, в том числе белковые. В данной работе было исследовано влияние бычьего сывороточного альбумина (БСА, гидрофильная компонента смесей) на смачиваемость мембран, изготовленных на основе трех полиэфиров (ПГБВ, ПЛА и ПКЛ). Для создания мембран мы использовали метод электроспиннинга. Он позволяет изготовить субмикронные волокна, которые имитируют структуру внеклеточного матрикса мягких тканей. Для контроля структуры мембран использовали сканирующую электронную микроскопию (СЭМ), смачиваемость измеряли методом лежащей капли.

Ранее нами было установлено, что добавление альбумина к ПГБВ приводит к улучшению смачиваемости, что было интуитивно ожидаемо, т.к. внесение гидрофильной компоненты в состав мембраны должно улучшать ее смачиваемость. Однако оказалось, что эта закономерность не универсальна. Она наблюдалась для ПГБВ и ПКЛ (Рисунок 1 а, в), но для ПЛА наблюдалась обратная закономерность - краевой угол смачивания увеличивался при добавлении БСА (Рисунок 1 б).

Таким образом, обнаружено нетривиальное влияние альбумина на смачиваемость электроформованных мембран на основе полиэфиров. Мембраны из ПКЛ и ПГБВ становятся более гидрофильными, если добавлять в них альбумин, а мембраны из ПЛА, наоборот, более гидрофобными. В дальнейшем планируется исследование систем на основе ПЛА в более широком диапазоне составов, а также спектроскопические исследования. Полученные результаты могут использоваться для разработки новых биосовместимых изделий, а также для исследования фундаментальных особенностей взаимодействия между полиэфирами и белками.

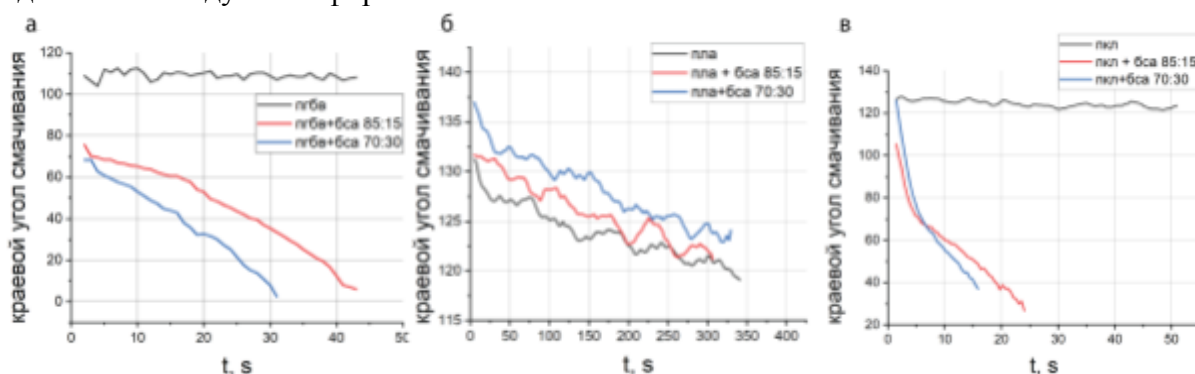


Рисунок 1. Зависимости краевого угла смачивания мембран от времени. (а) мембраны на основе ПГБВ, (б) мембраны на основе ПЛА, (в) мембраны на основе ПКЛ.



## **Б46. ВЫБОР СИСТЕМЫ СБОРКИ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ С НУКЛЕАЗАМИ CAS9 И CAS12A ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ, РЕЛЕВАНТНЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ CAR-T-КЛЕТОК**

Сильченко Д. А.<sup>1,2,\*</sup>, Круглова Н. А.<sup>1</sup>

1. Институт биологии гена РАН, Вавилова ул., д. 34/5, Москва, Российская Федерация, 119334

2. Биологический факультет МГУ, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, Российская Федерация, 119234

\**dsilch.work@mail.ru*.

**Ключевые слова:** CAR-T-клетки, CRISPR/Cas, VLP, геномное редактирование

Для повышения эффективности CAR-T-клеточной терапии, а также получения аллогенных универсальных CAR-T-клеток предлагается подход, основанный на геномном редактировании. Наиболее перспективными мишенями являются гены, кодирующие Т-клеточный рецептор, например ген *TRAC*, и ген *B2M*, нокаут которых может позволить получить универсальные CAR-T-клетки. Также интерес представляют гены иммунных контрольных точек, такие как *PDCD1* и *CTLA4*, нокаут которых может позволить снизить влияние супрессорного опухолевого окружения. Для получения CAR-T-клеток с улучшенными свойствами необходимы эффективные методы доставки CRISPR/Cas в Т-клетки. Перспективным подходом является доставка рибонуклеопротеиновых (РНП) комплексов нуклеазы и гидовой РНК (гРНК) при помощи вирусоподобных частиц (VLP) на основе структурных белков вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

Целью данной работы стало сравнение трёх систем сборки VLP, две из которых основаны на слиянии нуклеазы Cas и белка Gag (системы Cas-VLP и eVLP), а третья система NanoMEDIC – на формировании комплекса между FKBP12-Gag и FRB-Cas в присутствии аналога рапамицина AP21967. Все три типа VLP были протестированы с двумя типами нуклеаз – SpCas9 и AsCas12a. Ранее прямого сравнения этих систем, а также VLP с разными нуклеазами, не проводилось. В качестве мишеней для редактирования выступали гены *TRAC*, *B2M*, *PDCD1* и *CTLA4*.

Сначала для каждого гена по данным литературы были подобраны гРНК, которые тестировали в условиях электропорации в Т-клеточной линии Jurkat. Уровень редактирования *TRAC*, *B2M* и *PDCD1* оценивали методом проточной цитофлуориметрии (для *PDCD1* – в условиях активации клеток), а для *CTLA4* оценивали уровень инделов методом ICE.

Далее с помощью продукции в клетках 293Т были получены шесть типов VLP с гРНК против *B2M*, которыми трансдуцировали клетки Jurkat и оценивали уровень нокаута *B2M* на 6 день после трансдукции методом проточной цитофлуориметрии. Одинаковый уровень нокаута (около 55%) наблюдался для систем NanoMEDIC и eVLP с нуклеазой SpCas9. Для системы Cas-VLP с SpCas9 максимальный уровень нокаута был ниже (40%). Все три системы показали меньшую эффективность с нуклеазой AsCas12a по сравнению с SpCas9.

Аналогичным образом было проведено тестирование eVLP с нуклеазой SpCas9 и VLP NanoMEDIC с нуклеазой AsCas12a для редактирования гена *TRAC*. Система eVLP с SpCas9 позволила достичь в среднем 24% нокаута, а система NanoMEDIC с AsCas12a – в среднем 31% нокаута.

Кроме этого, была получена донорная конструкция для нокина в ген *TRAC*. Конструкция кодировала пептид MT-C34, который является ингибитором слияния ВИЧ с клеткой и служит удобной модельной последовательностью для нокина благодаря небольшой длине и экспрессии на поверхности клетки. При тестировании данной

плазмиды в условиях электропорации клеток Jurkat нокин был подтвержден на генетическом уровне секвенированием по Сенгеру. В дальнейшем планируется заменить MT-C34 на CAR, что позволит экспрессировать химерный антигенный рецептор под эндогенным промотором.

## Б47. КЛАСТЕРНЫЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГИСТОНОВ H2B.S

Сингх-Пальчевская Л.<sup>1\*</sup>, Шайтан А.К.<sup>12</sup>

1. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

2. Национальный Исследовательский Университет Высшая Школа Экономики

\*l.singh@intbio.org.

**Ключевые слова:** биоинформатика, хроматин, гистоны, искусственный интеллект

H2B.S представляет собой малоизученный вариант гистона, который уплотняет неактивный хроматин в семенах цветковых растений с помощью своего внутренне-неупорядоченного региона в N-концевом хвосте [1, 2]. Для того, чтобы оценить роль этого региона в различных таксономических группах, мы провели иерархическую кластеризацию аминокислотных последовательностей N-концевых хвостов гистона H2B.S и проанализировали их филогенетическое распределение. Несмотря на общую низкую консервативность (<26% идентичности), мы выявили 5 кластеров, в которых попарная идентичность составляет более 50%. Результаты поиска гомологов показали, что три кластера демонстрируют высокую специфичность к семействам *Brassicaceae*, *Poaceae* и *Fabaceae*. **Еще два кластера характеризуются исключительно высокой консервативностью (≥90% идентичности) и обнаружены в пределах родов *Citrus* и *Piper*.** При этом были найдены гомологичные последовательности из отряда *Sapindales*, демонстрирующие умеренное сходство (58–60% идентичности) с кластером, специфичным для рода *Citrus*. Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что N-концевые хвосты гистона H2B.S могут быть ассоциированы с принадлежностью к определенным таксономическим группам, что может отражать их уникальную функциональную специализацию в процессе эволюции семян цветковых растений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-74-10012.

### Список литературы

1. Buttress T. et al. Histone H2B.8 compacts flowering plant sperm through chromatin phase separation // *Nature*. 2022. Vol. 611, № 7936. P. 614–22.
2. Jiang D. et al. The evolution and functional divergence of the histone H2B family in plants // *PLOS Genetics*. 2020. Vol. 16, № 7. P. e1008964.

## Б48. НОВЫЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА СОСТОЯНИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ИСКУССТВЕННОЙ НЕЙРОННОЙ СЕТИ

Ситдикова К.К.<sup>1\*</sup>, Черкашенко В.Н.<sup>1</sup>, Сабурина И.Н.<sup>1</sup>

ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии»

\*sitd-kseniya@yandex.ru

**Ключевые слова:** самоорганизующиеся сети Кохонена (СОКК), эпителиально мезенхимальный переход (ЭМП), состояние системы (аттрактор).

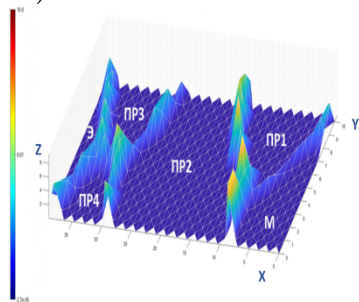
Цель работы – определить количество состояний регуляторной сети (РС), описывающей эпителиально-мезенхимальный переход, содержащей 16 молекулярно-генетических маркеров [1]. На сегодняшний день отсутствует ответ на вопрос, через какое количество состояний проходят клетки при ЭМП. ЭМП имеет общепатологическое значение, играя огромную роль в развитии организмов, онкогенезе и, как показали последние исследования, в регенерации. Так же не существует единого подхода к методам определения количества кластеров (состояний) в динамике биологических систем. В большинстве публикаций анализируются 2х или 3х мерные образы сложных биологических систем и выделяемые в них состояния, что часто искажает исходную картину и делает задачу определения состояний крайне актуальной.

Для решения данной задачи мы использовали метод кластеризации, обладающий четырьмя обязательными свойствами:

- визуализации многомерных данных в 2-х или 3-х мерном пространстве
- отсутствие априорного задания количества кластеров в данных;
- сохранение топологии исходных данных;
- обеспечение содержательной интерпретации выявляемых состояний.

Предложенное нами решение основано на применении искусственной нейронной сети (ИНС), называемой СОКК. Эта сеть соответствует всем 4-м приведенным критериям.

Для получения данных был проведен численный эксперимент, в котором с использованием графа РС и функции Хилла была построена система 16 дифференциальных уравнений. Коэффициенты данной системы были взяты из работы [1]. На основе этой системы уравнений были получены 10000 траекторий динамики РС для разных начальных условий, задаваемых для регистрируемых в экспериментах значений каждой из 16 переменных. Каждая из 10000 симуляций давала последовательность векторов, которые служили входными данными для ИНС СОКК. Полученная для этого эксперимента карта является проецированием последовательностей 16 мерных векторов в 3-х мерное пространство (приведена на рисунке).



Оси X и Y представляют собой сложные нелинейные комбинации исходных переменных, а ось Z характеризует расстояние между последовательными временными срезами (похожесть векторов). Видно, что динамика РС ЭМП содержит в себе 6 кластеров (синие области между выступающими из плоскости X-Y границами), что согласуется с тем интервалом значений, которые приводятся в литературе. Буквами «Э» и «М» обозначены состояния эпителия и мезенхимы, а Пр<sub>1-4</sub> - промежуточные состояния. Полученная карта может быть «раскрашена» значениями каждой из 16 переменных, что позволяет провести содержательную интерпретацию выявленных состояний и ответить на вопрос о

мезенхимы, а Пр<sub>1-4</sub> - промежуточные состояния. Полученная карта может быть «раскрашена» значениями каждой из 16 переменных, что позволяет провести содержательную интерпретацию выявленных состояний и ответить на вопрос о

количестве состояний, а предложенный метод позволяет выявлять состояния в произвольных многомерных биологических системах.

#### Список источников

1. Lang J., Nie Q., Li C. Landscape and kinetic path quantify critical transitions in epithelial-mesenchymal transition. *Biophys J.* 2021; 120(20):4484-4500.

#### **Б49. ГОРМОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ У КАСПАЗА-2 НОКАУТНЫХ МЫШЕЙ СВЯЗАННЫЕ С ИНФЕРТИЛЬНОСТЬЮ**

Смольянинова Л.В.<sup>1,2,\*</sup>, Мамедова А.Р.<sup>1,2</sup>, Скрыбин Б.В.<sup>3</sup>, Аверина О.А.<sup>4,5</sup>, Шилова А.А.<sup>1,6</sup>, Попов В.С.<sup>1,6</sup>, Никишин Д.А.<sup>7</sup>, Иоутси В.А.<sup>8</sup>, Копейна Г.С.<sup>1,2</sup>, Животовский Б.Д.<sup>1,2,9</sup>

1. ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

2. Факультет фундаментальной медицины МНОИ МГУ, Москва, Россия

3. Core Facility of Transgenic Animal and Genetic Engineering Models, University of Münster, Münster, Germany

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

5. Институт функциональной геномики МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

6. Институт регенеративной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

7. Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

8. ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» Минздрава России, Москва, Россия

9. Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

\*smolyaninovaalarisa1@gmail.com

**Ключевые слова:** каспаза-2, фертильность, прогестерон, 20-бетадигидропрогестерон,

Каспаза-2 принадлежит к семейству цистеиновых протеаз, участвует в апоптозе, в поддержании генетической стабильности, в регуляции клеточного цикла и некоторых других физиологических процессах. Каспаза-2 может играть роль в подавлении развития опухолей. Так, у больных лейкоемий наблюдается делеция гена каспазы-2. Однако нокаутные по каспазе-2 мыши не демонстрируют усиление процесса опухолеобразования и характеризуются такими фенотипами, как, например, снижение числа ооцитов, увеличение количества мотонейронов, дефекты клеточного цикла, геномная нестабильность, и переключение метаболизма жирных кислот на метаболизм углеводов. Различие в полученных фенотипах нокаутных по каспазе-2 мышей, затрудняет однозначно определить ее роль в не-апоптотических функциях и в том, числе в процессах опухолеобразования.

Для выяснения этой роли, применяя технологию CRISPR-Cas9, мы сделали нокаут каспазы-2 на линии мышей FVB путем делеции 20 нуклеотидов в экзоне 5, где кодируется активный сайт фермента, и за счет механизма нонсенс-опосредованного распада РНК не образуются усеченные формы белка каспазы-2. Нами было подтверждено отсутствие РНК и белка каспазы-2 в разных тканях, полученных нокаутных животных. Оценка морфометрических показателей не выявила разницы между животными дикого и нокаутными типа за исключением одного параметра, такого как повышение количества висцерального жира у нокаутных самок. Результаты скрещивания нокаутных самок выявили существенную разницу в сравнении с самками дикого типа. Нокаутные самки не давали потомства, но при этом у них формировалось небольшое количество эмбрионов (2-3) на сроке E7.5 и E12.5 с признаками деградации и задержки развития. Исследование уровня прогестерона, ответственного за поддержание беременности показало, что у нокаутных самок он существенно снижен, и при этом происходит повышение уровня его неактивного метаболита - 20β-дигидроксипрогестерона. У нокаутных самок также обнаруживается повышение экспрессии фермента AKR1C18, отвечающего за превращение прогестерона в 20β-дигидроксипрогестерон. Кроме того, мы оценили уровень экспрессии фермента Cyp11a1, осуществляющего синтез прегненолона (предшественник прогестерона) из холестерина и его уровень также оказался выше у нокаутных самок, что указывает на

возможное нарушение метаболизма жиров у нокаутных самок и коррелирует с повышением у них висцерального жира.

Таким образом, снижение фертильной функции у нокаутных по каспазе-2 самок определяется повышением уровня неактивного метаболита прогестерона, что приводит к невозможности полноценного развития плода при беременности.

### АЗ1. ТЕХНОЛОГИЯ 3D-ПЕЧАТИ МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПОВ ДЛЯ ГЕНЕРАЦИИ ГИДРОГЕЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ С ИММОБИЛИЗИРОВАННЫМИ МИКРОВОДОРОСЛЯМИ

Спиридонова А.Л.<sup>1\*</sup>

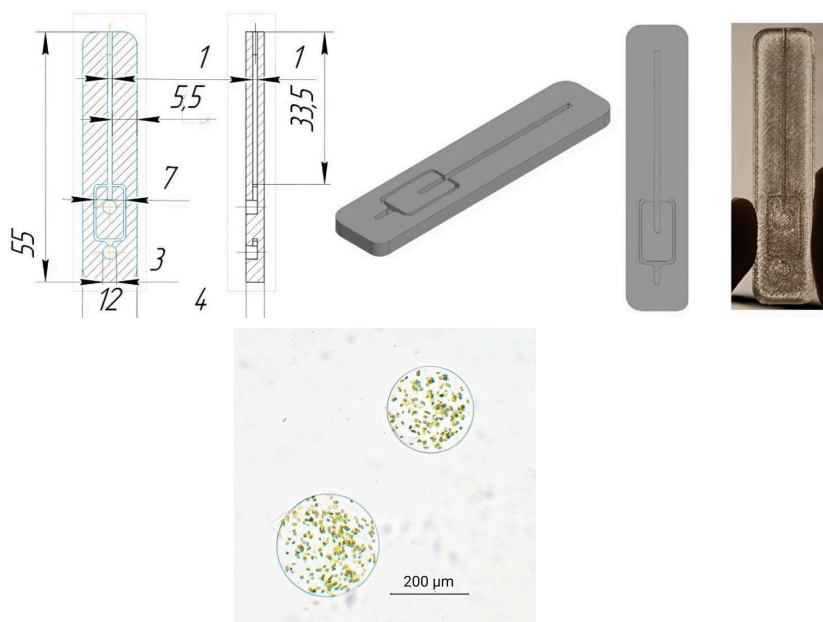
1. Удмуртский Государственный Университет

\*seiridonovatona@gmail.com

**Ключевые слова:** биотехнология, экологическая биоинженерия, биоматериалы

В работе представлена и экспериментально апробирована комплексная технология изготовления микрофлюидных чипов, предназначенных для генерации монодисперсных альгинатных сфероидов. Разработка включала комбинацию численного компьютерного моделирования гидродинамических процессов в среде COMSOL Multiphysics с последующей аддитивной реализацией устройств методом FDM-печати с использованием PETG-пластика [1, 2]. В результате оптимизации геометрических параметров микрофлюидного чипа было установлено, что конфигурация с соотношением диаметров входных каналов дисперсной и непрерывной фаз 1:0,5 мм обеспечивает стабильное и воспроизводимое формирование сфероидов с минимальным разбросом размеров. Для предотвращения слияния капель и оптимизации сбора сфероидов была использована система с регулируемым канальным удлинением на основе политетрафторэтиленовой (PTFE) трубки с внутренним диаметром 0,3 мм.

Биосовместимость и функциональность разработанной технологии была продемонстрирована на примере иммобилизации клеток микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*, использовавшейся в качестве модельного объекта. Проведенный морфологический анализ подтвердил равномерное пространственное распределение клеточной культуры в объеме синтезированных сфероидов без признаков нарушения жизнеспособности.



Полученные результаты свидетельствуют о практической значимости предложенного подхода для создания доступных и функциональных микрофлюидных чипов. Разработанные устройства перспективны для применения в различных областях



биотехнологии и биомедицины, включая разработку биосенсоров, систем направленной доставки биологически активных соединений и экологических технологий очистки.

#### Список литературы

1. Anyaduba T. D., Otoo J. A., Schlappi T. S. Picoliter Droplet Generation and Dense Bead-in-Droplet Encapsulation via Microfluidic Devices Fabricated via 3D Printed Molds //Micromachines. – 2022. – Т. 13. – №. 11. – С. 1946
2. Kara A. et al. Engineering 3D printed microfluidic chips for the fabrication of nanomedicines //Pharmaceutics. – 2021. – Т. 13. – №. 12. – С. 2134.

## **Б50. МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ИОН-БЕЛКОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В КАЛИЙ-ХЛОРНОМ КОТРАНСПОРТЕРЕ KCC2**

Степанова Е. Ю.<sup>1,2\*</sup>, Ивонцин Л.А.<sup>2</sup>, Машковцева Е.В.<sup>1,2</sup>, Нарциссов Я.Р.<sup>2,3</sup>

1. ФГАОУ ВО "Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова" МЗ РФ, Москва, Россия

2. НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, Россия

3. Группа биомедицинских исследований, БиДиФарма ГмбХ, Зик, Германия

\*stepanova@icmph.org.

**Ключевые слова:** молекулярная динамика, мембранные белки, KCC2

Калий-хлорный котранспортер KCC2 играет ключевую роль в функционировании центральной нервной системы, обеспечивая поддержание низкой внутриклеточной концентрации ионов хлора в нейронах. Формируемый им градиент  $\text{Cl}^-$  является критически важным для реализации тормозного действия нейромедиаторов гамма-аминомасляной кислоты и глицина. Снижение активности KCC2 рассматривается как один из центральных патогенетических механизмов развития неврологических заболеваний, особенно эпилепсии.

Структурные данные по семейству KCCs (KCC1-4), полученные методом криоэлектронной микроскопии, показали несоответствие с ранее установленной стехиометрией транспорта  $1\text{K}^+:1\text{Cl}^-$ . В трансмембранном домене переносчика были обнаружены три небелковые электронные плотности, соответствующие двум анионам  $\text{Cl}^-$  и одному катиону  $\text{K}^+$ . В ряде исследований предполагается наличие двух сайтов связывания хлора – основного транспортного и дополнительного аллостерического, однако их функциональная роль остается до конца не изученной.

Целью данной работы является проведение структурно-функционального анализа трех предполагаемых сайтов связывания ионов в калий-хлорном котранспортере KCC2. Основное внимание уделяется проверке гипотезы о существовании дополнительного аллостерического сайта для  $\text{Cl}^-$  и оценке его вклада в механизм ионного транспорта.

С помощью веб-сервиса CHARMM-GUI был собран мембранно-белковый комплекс человеческого калий-хлорного котранспортера KCC2 (PDB ID: 6M23) со всеми ионами в сайтах связывания. После этого было проведено молекулярно-динамическое моделирование комплекса в программном пакете GROMACS при периодически граничных условиях и с использованием силового поля CHARMM36.

На основе МД траекторий были определены аминокислотные остатки, формирующие сайты связывания ионов. Структура аллостерического сайта связывания указывает на его высокую аффинность к иону хлора: стабилизация обеспечивается непосредственным взаимодействием с атомами основной цепи Gly413, Ile414, Met415 и гидроксильной группой Thr569, при этом сам сайт характеризуется компактной геометрией и ограниченным водным окружением. В отсутствие аллостерического  $\text{Cl}^-$  в своем сайте связывания, транспортируемый  $\text{Cl}^-$  способен занять его положение, что подтверждает высокую аффинность и селективность данного сайта. Стабильность положения иона калия обеспечивается кооперативным участием как транспортируемого, так и аллостерического ионов хлора. Отсутствие любого из анионов приводит к снижению времени удержания  $\text{K}^+$  в его сайте связывания, что указывает на их совместную роль в формировании устойчивой координации в процессе транспортного цикла. МД моделирование также показало наличие общей гидратной оболочки у транспортируемых ионов  $\text{K}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , что способствует дополнительной

стабилизации ионной пары и может играть функциональную роль в процессе их транспорта.

## Б51. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ IRES РИНОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА И ВИРУСА ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА ДЛЯ КОЭКСПРЕССИИ СУБЪЕДИНИЦ ГЛИКОПРОТЕИНОВЫХ ГОРМОНОВ

Стренина Д.О.<sup>1\*</sup>, Синегубова М.В.<sup>1</sup>, Воробьев И.И.<sup>1</sup>, Орлова Н.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, Москва,

\**dariastronina@gmail.com*

**Ключевые слова:** IRES, хорионический гонадотропин человека, коэкспрессия, клетки CHO, риновирус человека, реинициация трансляции

**Введение:** Внутренний рибосомный сайт связывания (IRES) вируса энцефаломиокардита (EMCV) широко применяется в биотехнологии для коэкспрессии нескольких белков из одной матричной РНК. Однако его использование в многогенных конструкциях часто осложнено наличием протяженных прямых повторов, что может снижать стабильность вектора. Мы исследовали возможность замены IRES EMCV на IRES риновируса человека типа 89 (HRV89) для экспрессии субъединиц хорионического гонадотропина (ХГЧ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ) человека. Цель работы – сравнить эффективность IRES HRV89 и эталонного IRES EMCV в системе коэкспрессии фармацевтически значимых гликопротеиновых гормонов.

**Материалы и методы:** Были созданы трицистронные генетические конструкции для экспрессии в клетках CHO, содержащие гены  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей ХГЧ и ЛГ и маркера дигидрофолатредуктазы (DHFR). Для трансляции  $\alpha$ -цепи использовали IRES HRV89, а для DHFR – IRES EMCV.

**Результаты и обсуждение:** Показано, что эффективность IRES HRV89 для коэкспрессии цепей ХГЧ сопоставима с эталонным IRES EMCV. Уровень секреции гетеродимерного ХГЧ, а также процент реинициации трансляции (16% для HRV89 против 17% для EMCV) не имели значимых различий. Отношение  $\beta$ -цепи к гетеродимеру для конструкции с IRES HRV89 составило  $5,77 \pm 0,9$ , а для контроля с IRES EMCV –  $5,46 \pm 0,6$ , что также свидетельствует о сходном качестве сборки белка. Это доказывает, что IRES HRV89 является рабочей альтернативой для создания генетических конструкций без повторов.

Однако сравнение эффективности тех же IRES при экспрессии цепей лютеинизирующего гормона (ЛГ) выявило резкое снижение эффективности IRES HRV89. Этот результат является неожиданным, поскольку  $\alpha$ -субъединицы у ХГЧ и ЛГ идентичны, а их  $\beta$ -субъединицы являются высокоомологичными паралогами.

**Выводы:** Полученные данные демонстрируют, что IRES риновируса человека может успешно использоваться для коэкспрессии цепей ХГЧ, обеспечивая эффективность на уровне эталонного IRES EMCV. В то же время, обнаружена сильная зависимость эффективности IRES HRV89 от природы коэкспрессируемого белка, что проявляется в его резко сниженной активности в случае с ЛГ. Данный феномен указывает на существование сложной зависимости между конкретной кодируемой последовательностью в полицистронной мРНК и эффективностью трансляции, механизмы которой требуют дальнейшего изучения.

### Список литературы:

1. Bochkov Y.A., Palmenberg A.C. Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location // *Biotechniques*. 2006. Vol. 41, № 3. P. 283–292.
2. Chai Y. et al. Human rhinovirus internal ribosome entry site element enhances transgene expression in transfected CHO-S cells // *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 6661.

## Б52. БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНА S100B В ВЕКТОР pComb3XSS ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА

Сыроватская Я. В.<sup>1\*</sup>, Нурбеков М.К.<sup>2</sup>

1. Первый Московский Государственный медицинский университет, Москва, Россия

2. Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

\*yana.syr@bk.ru.

**Ключевые слова:** биоинформатическое моделирование, *in silico* клонирование, ген S100B, рекомбинантная плазмида

Целью данной работы была предварительная *in silico* проверка процесса клонирования кДНК гена S100B [1] в вектор pComb3XSS в платформе Benchling для последующей экспрессии целевого белка.

Основная идея работы заключается в применении биоинформатического моделирования для создания рекомбинантной плазмиды, обеспечивающей последующую экспрессию белка S100B. Данный белок играет ключевую роль в регуляции клеточных процессов, а его дисфункция связана с нейродегенеративными заболеваниями и онкопатологиями, что делает получение его рекомбинантной формы важным этапом в изучении его функций. Предварительное компьютерное моделирование позволяет подтвердить корректность вставки гена и сохранение функциональности векторной конструкции.

Предложенный путь решения включает использование платформы Benchling для компьютерного проектирования рекомбинантной плазмиды. Выбраны уникальные сайты рестрикции SacI и XceI, проведена визуализация и верификация этапов рестрикции, лигирования и контроля сборки конечной конструкции.

В ходе эксперимента была успешно смоделирована полная процедура клонирования и спроектирована рекомбинантная плазмида pComb3XSS-S100B (рис. 1). Биоинформатический анализ подтвердил корректность сборки: сохранение рамки считывания, целостность ключевых функциональных элементов вектора (промотора, сайта связывания рибосомы, гена антибиотикорезистентности).

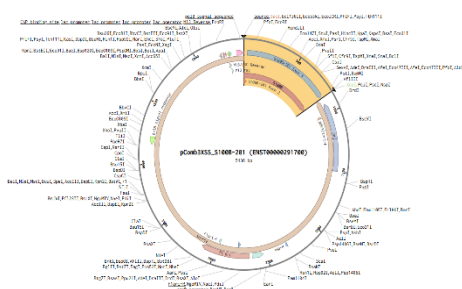


Рис. 1. Рекомбинантная плазмида pComb3XSS-S100B

Полученные результаты демонстрируют эффективность биоинформатического подхода для планирования экспериментов по молекулярному клонированию. *In silico* верификация позволяет не только минимизировать материальные и временные затраты, но и закладывает основу для создания функционально активной рекомбинантной системы экспрессии белка S100B, что открывает возможности для его последующего изучения в биомедицинских исследованиях.

Список литературы

1. Nurbekov, M. K., Terekhina, O. L., Dmitrenko, O. P., Lobanov, A. V., Lobanova, N. N. Cloning of S100B cDNA in *E. coli* under the control of an inducible promoter and its heterologous expression // Pathogenesis. 2018. Vol. 16, № 4. P. 148–152.

## **А32. МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ИЗ ГЛУБОКОГО ПОДЗЕМНОГО ИСТОЧНИКА БАКСАНСКОЙ НЕЙТРИННОЙ ОБСЕРВАТОРИИ**

Тарасов К.А.<sup>1\*</sup>, Зарубин М.П.<sup>1</sup>, Яхненко А.С.<sup>1</sup>, Гангапшев А.С.<sup>2</sup>, Кравченко Е.В.<sup>1</sup>

1. *Лаборатория ядерных проблем, Объединённый институт ядерных исследований, Дубна*

2. *Баксанская нейтринная обсерватория, Институт ядерных исследований РАН, Москва*

\*ktarasov@jinr.ru

**Ключевые слова:** метагеном, биогеохимический цикл азота, горячий источник, биоплёнка, автотрофы.

По разным подсчётам биомасса организмов, обитающих глубоко под землёй, составляет 10-20% от всей биомассы планеты<sup>1</sup>. Подобные микроорганизмы представляют интерес в связи с исследованиями в таких областях науки как астробиология<sup>2</sup>, биотехнология<sup>3</sup>, теория эволюции<sup>4</sup>. Однако, в связи с труднодоступностью глубокая подземная биота изучена относительно слабо. В данной работе мы представляем результаты метагеномного исследования микробного сообщества биоплёнки из глубокого подземного источника Баксанской нейтринной обсерватории (Кабардино-Балкария, Россия), расположенного на глубине 2 км под поверхностью г. Андырчи.

Сообщество источника представлено, в основном, типами Proteobacteria (74% метагеномной ДНК) и Planctomycetota (16%). Типы Nitrospirota, Мухососсота, Цианобактериота, Арматимонадота и Гемматимонадота также представлены в сообществе и составляют в сумме около 10%. Сообщество имеет сложный состав: в нём имеются продуценты первичных органических соединений, консументы, хищные бактерии. Первичными источниками углерода являются абиогенный метан (присутствуют метанотрофы I и II типа), а также углекислый газ (имеются представители, осуществляющие фиксацию углекислого газа в цикле Кальвина, пути Вуда-Льюнгадала, цикле Арнона). Биогенные реакции цикла азота представлены широко и разнообразными группами микроорганизмов: в источнике имеются азотфиксаторы, нитрификаторы обеих стадий, денитрификаторы, анаммокс-бактерии, организмы, разлагающие сложные органические соединения азота. Биогенные реакции цикла серы в источнике представлены слабо.

Представлена экологическая модель обмена веществ в источнике. Восстановленные соединения железа, водород, метан и аммиак вулканического и корового происхождения, вероятно, являются источниками энергии для микробного сообщества. Произведено сравнение состава источника БНО с другими данными из глубоких подземных гранитных местообитаний и карстовых пещер по всему миру, обсуждены совпадающие и отличительные признаки этих сообществ.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 24-24-00003.

Список литературы:

1. Magnabosco et al. The biomass and biodiversity of the continental subsurface // Nature Geoscience. 2018.
2. Onstott et al. Paleo-Rock-Hosted Life on Earth and the Search on Mars: A Review and Strategy for Exploration // Astrobiology. 2019.
3. Rawat, Chauhan, Pandey. Extremophiles and their expanding biotechnological applications // Archives of Microbiology. 2024.
4. Becraft et al. Evolutionary stasis of a deep subsurface microbial lineage // The ISME Journal. 2021.

### **Б53. ИНТЕГРАТИВНЫЙ ОТБОР ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫХ МИШЕНЕЙ CRISPR/CAS9 ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ**

Узденов А.А.\*<sup>1</sup>, Грибкова А.К.<sup>1</sup>, Шайтан А.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

\* *azam02334@gmail.com*

Интегративный отбор высокоспецифичных мишеней CRISPR/Cas9 необходим как для фундаментальных исследований, так и для прикладных задач генетического редактирования. В этой работе мы предлагаем стратегию выбора генов-мишеней, объединяющую транскриптомику, эпигенетические метки и химические модификации ДНК. Она также предусматривает автоматическую оценку выбранных мишеней наиболее надёжными методами.

Сначала для линий K562, NHEK и HEK293 были собраны данные ChromHMM, RNA-seq и бисульфитного секвенирования - для классификации генов как «активные» и «неактивные». Такая категоризация важна при определении цели регуляции - репрессия или активация.

Сопоставление генов из множеств, полученных разными методами, подтвердило их корректность (корреляция Пирсона между методами  $r = 0,6-0,8$ ) и показало высокую согласованность источников.

Был реализован алгоритм на Python, который извлекает из промоторных последовательностей все 20-нуклеотидные сайты с мотивом NGG и вычисляет показатель on-target (модель Doench-Fusi, 2016), специфичность off-target (Hsu, 2013) и возможность образования триплексных структур ДНК-ДНК-РНК.

Для оценки воспроизводимости подхода были выполнены расчёты для линии K562 и для бактериального плазмидного вектора, экспрессируемого в HEK293. Лучшие кандидаты-мишени затем были направлены на экспериментальную проверку.

Результатом работы стал программный пакет, который автоматизирует выбор sgRNA с учётом эпигеномики и структуры ДНК. Его использование повышает точность выбора генов-мишеней и снижает число внецелевых воздействий. Предложенную стратегию легко адаптировать к любой клеточной системе; она может служить основой рационального дизайна CRISPR.

Исследование выполнено при поддержке Минобрнауки России, грант № 075-15-2024-539.



## Б54. МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДНК-ГИСТОНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

Федулова А. С.<sup>1\*</sup>, Армеев Г.А.<sup>1</sup>, Косарим Н.А.<sup>1</sup>, Шаряфетдинова А.С.<sup>1</sup>, Бельский М.М.<sup>1</sup>, Шайтан А.К.<sup>1</sup>

*1. МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биоинженерии*

*\*a.kniazeva@intbio.org*

**Ключевые слова:** хроматин, эпигенетика, молекулярное моделирование

Взаимодействие между ДНК и гистонами играет фундаментальную роль в формировании хроматина, который структурирует генетический материал в ядре клеток эукариот. Нуклеосома (комплекс ДНК и гистоновых октамера) является структурной единицей хроматина. Она представляет собой динамическую платформу, которая участвует в регулировании ключевых геномных процессов. Для понимания механизмов эпигенетической регуляции работы хроматина важно изучение внутренней динамики гистонов и их взаимодействий с ДНК. Использование метода молекулярной динамики (МД) позволяет исследовать функциональные движения нуклеосом и изучать молекулярные механизмы их динамики.

В рамках работы были выполнены масштабные расчёты методом МД с применением суперкомпьютеров. В результате анализа была выявлена характерная мода внутренней динамики гистоновых димеров, образованных в виде структурного мотива «рукопожатие». Обнаруженная мода представляет собой изгиб гистонов и описывается углом между длинными  $\alpha 2$ -спиралями гистонов. Показана связь пластичности гистонов H2A-H2B с динамикой ДНК. В частности, степень изгиба H2A-H2B зависит от длины и конформации фрагментов ДНК, взаимодействующего с димером. Пластичность димера необходима для прохождения скольжения ДНК в нуклеосоме и спонтанного откручивания концов нуклеосомной ДНК, что важно для обеспечения доступности ДНК в геномных процессах.

Было охарактеризовано возможное влияние аминокислотной последовательности гистонов на динамику нуклеосом на примере вариантных гистонов H2A.Z и H2A.J. Для H2A.Z показано смещение динамического равновесия в области L1-петли/N-конца  $\alpha 2$ -спирали, что приводит к повышенной пластичности H2A.Z-H2B димера и усилению динамики откручивания ДНК. Для H2A.J замена S40A в L1-петле приводит к потере стабилизирующей водородной связи и появлению альтернативных конформаций петли, способствующих усилению междимерных взаимодействий в нуклеосоме, что может объяснять ее повышенную термостабильность.

Для тетрасом (комплексов тетрамера (H3-H4)<sub>2</sub> с ДНК) показано, что ДНК становится более динамичной благодаря откручиванию ДНК в тетрасоме. Пластичность тетрамера (H3-H4)<sub>2</sub> позволяет ДНК совершать переходы между конформациями с разной суперспирализацией, что снижает барьер для прохождения РНК-полимеразы II.

Комплексное моделирование позволило выявить ранее не описанные механизмы динамики нуклеосом. Показано, что внутренняя пластичность гистоновых димеров является ключевым свойством, связывающим структурные изменения гистонов с функционально важными движениями ДНК. Изменение динамических свойств гистонов через вариации их последовательности представляет собой важный механизм регуляции доступности ДНК и стабильности хроматина. Работа поддержана грантом РФФИ № 23-74-10012. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

## Б55. РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ДНК-ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Фескин П.Г.<sup>1\*</sup>, Шайтан А.К.<sup>1</sup>

*1. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова*

*\*p.feskin@intbio.org.*

**Ключевые слова:** биоинженерия, генетические технологии, ДНК-нанотехнологии

Современная биология стремится не только к изучению существующих природных систем, но и к созданию новых биологических конструкций с заданными функциями. Одной из ключевых задач в этой области является программирование молекулярных взаимодействий для точного контроля клеточных процессов, таких как регуляция экспрессии генов. Особую роль в этой области играют ДНК-нанотехнологии, которые используют свойства нуклеиновых кислот для конструирования программируемых молекулярных устройств. Явление кооперативности повсеместно используется клеточной машинерией в целях повышения точности и эффективности контроля, однако ее применение в ДНК-нанотехнологиях до сих пор ограничено.

В данной работе была разработана и исследована система взаимодействующих олигонуклеотидов с лиганд-опосредованной кооперативностью. Такой механизм представляет особый интерес для применения в регуляции экспрессии клеточных мРНК, поскольку позволяет контролировать уровень мРНК через технологию антисенсовых олигонуклеотидов.

С использованием методов оптимизации библиотеки SciPy [1] были проанализированы равновесные реакции взаимодействия олигонуклеотидов. На основе экспериментально охарактеризованной кооперативной системы [2] и результатов моделирования была предложена новая конструкция, в которой сочетаются конформационные переходы олигонуклеотидов и механизмы toehold-замещения [3]. Анализ модельных кривых насыщения подтвердил возможность повышения эффекта кооперативности. Далее с помощью веб-сервиса NUPACK [4] была рассчитана и термодинамически описана серия олигонуклеотидных последовательностей, соответствующих заданным параметрам. Проведённая симуляция лиганд-рецепторных взаимодействий на основе полученных термодинамических данных показала выраженную кооперативность системы.

Методом измерения тушения флуоресценции меченых олигонуклеотидов были получены термодинамические профили конформационных переходов лигандов, продемонстрировавшие наличие желаемых вторичных структур. Методом гель-электрофореза и измерения тушения флуоресценции было показано соответствие предсказаний взаимодействий олигонуклеотидов сервисом NUPACK и результатов экспериментов.

Таким образом, разработанная система олигонуклеотидов продемонстрировала высокий уровень эффективности. Полученные результаты открывают перспективы для программируемых молекулярных устройств в ДНК-нанотехнологиях.

Работа выполнена при поддержке научной и образовательной школы «Биология» в Московском Государственном Университете (No. 23-Ш04-13).

### Список литературы

1. SciPy. Официальный сайт программной библиотеки SciPy [Электронный ресурс]. URL: <https://scipy.org/> (дата обращения: 03.03.2025).
2. Kandimalla E. R. et al. Design, biochemical, biophysical and biological properties of cooperative antisense oligonucleotides // Nucleic acids research. 1995. Т. 23. №. 17. С. 3578-3584.

3. Yurke B., Mills A. P. Using DNA to power nanostructures // Genetic Programming and Evolvable Machines. 2003. Т. 4. С. 111-122.
4. NUPACK. Официальный сайт программного обеспечения NUPACK [Электронный ресурс]. URL: <https://www.nupack.org/> (дата обращения: 03.03.2025).

## Б56. МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА С КОМПОЗИТНЫМИ НАНОМАТЕРИАЛАМИ

Хоссаин М. А.<sup>1\*</sup>, Бонарцев А.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоинженерии

\*asifhossain38@yahoo.com

**Ключевые слова:** молекулярная динамика, биоинженерия, биополимер

Поли-3-оксибутират (ПОБ) – это биоразлагаемый полиэфир с перспективами применения в медицине и для сохранения окружающей среды. В нашем недавнем исследовании (1) были изучены композиты ПОБ, включающие комплексы наночастиц магнетита с нанолитами частично восстановленного оксида графена (воГ), и было показано, что эти наноразмерные комплексы значительно изменяют поверхностный заряд, кристалличность и морфологию матриц ПОБ, тем самым влияя на бактериальную адгезию и пьезоэлектрические отклики в низкочастотных магнитных полях. Эти результаты подчеркивают решающую роль совместимости на границе раздела между полимерным материалом ПОБ и производными графена для регуляции функциональных свойств разрабатываемых новых композитных материалов.

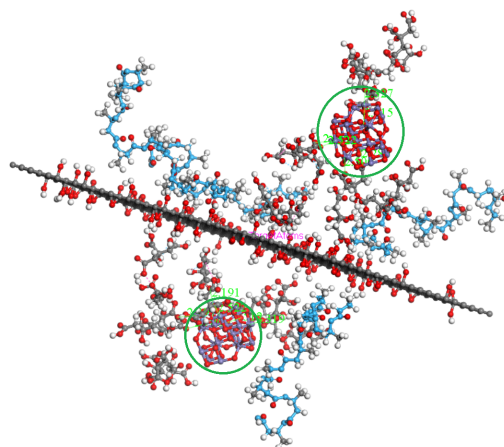


Рис 1: Моделирование конфигураций комплекса лимонной кислоты с манетитом и четырьмя цепями ПОБ на воГ. Ядро магнетита обведено зелёным, синяя цепь представляет РНВ. Серый слой — rGO.

В настоящей работе мы исследуем молекулярные механизмы, лежащие в основе таких взаимодействий, сосредоточившись на лимонной кислоте (ЛК) как на потенциальном медиаторе. ЛК может закрепляться на поверхностях rGO посредством кислородных функциональных групп, одновременно образуя водородные связи с эфирными группами РНВ, что открывает путь к улучшению дисперсии и межфазной адгезии. Для получения атомистического понимания мы сначала оптимизировали геометрию комплексов ЛК –магнетит с помощью теории функционала плотности (DFT). Впоследствии для выявления энергетически выгодных конфигураций ансамблей rGO–магнетит–ЛК было использовано моделирование с использованием локатора адсорбции, основанное на методе Монте-Карло. Этот вычислительный подход обеспечивает детальное структурное понимание того, как ЛК связывает неорганические и углеродные нанофазы с ПОБ, закладывая основу для рационального проектирования многофункциональных композитов на основе ПОБ, армированных графеновыми нанолитами, с улучшенными физико-химическими и биологическими характеристиками.

Список литературы

1. Voinova, V.V; et al. Adhesion of *Escherichia coli* and *Lactobacillus fermentum* to Films and Electrospun Fibrous Scaffolds from Composites of Poly(3-hydroxybutyrate) with Magnetic Nanoparticles in a Low-Frequency Magnetic Field. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 208. <https://doi.org/10.3390/ijms25010208>

## **Б57. ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА ГИБРИДНОГО БЕЛКА НА ОСНОВЕ TRAIL С МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩЕЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ**

Царькова О.А.<sup>1</sup>, Куковьякина Е.В.<sup>2</sup>, Исакова А.А.<sup>1,2</sup>, Гаспарян М.Э.<sup>2</sup>, Позднякова Н.В.<sup>3</sup>, Яголович А.В.<sup>1</sup>

*1. Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова*

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

*3. НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России*

*\*olga20040603@yandex.ru*

**Ключевые слова:** цитокин TRAIL, рецептор DR5, металлсвязывающая последовательность.

Создание рекомбинантных белков с противоопухолевой активностью является актуальным направлением в разработке новых лекарственных препаратов. Одним из перспективных объектов является цитокин TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), индуцирующий апоптоз в опухолевых клетках через взаимодействие с рецепторами смерти DR4 и DR5, не вызывая гибель здоровых клеток.

Цель работы заключалась в увеличении функциональной активности TRAIL путем получения гибридного белка на основе модифицированного цитокина с металлсвязывающей аминокислотной последовательностью, обеспечивающей возможность получения конъюгатов с различными ионами металлов. Это может обеспечить направленную доставку металлов с противоопухолевыми свойствами к месту опухолевого повреждения, а также комбинированное действие с TRAIL-индуцированной цитотоксичностью. Гибридный белок был экспрессирован в клетках *E. coli* штамма SHuffle B и очищен из растворимой клеточной фракции с помощью металл-хелатной и ионообменной хроматографии. Чистота белкового препарата была подтверждена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Корректность сборки структуры белка критически важна для сохранения его функциональной активности. Влияние гибридного белка на жизнеспособность опухолевых клеток было исследовано на клеточной линии глиобластомы человека U87MG с помощью колориметрического теста WST-8. Было показано, что гибридный белок сохраняет свою цитотоксическую активность, следовательно, добавление металлсвязывающей последовательности не оказывает негативного влияния на структуру белка. Таким образом, полученный гибридный белок на основе модифицированного цитокина TRAIL с металлсвязывающей аминокислотной последовательностью может быть использован для получения конъюгатов с ионами металлов и последующего исследования их биологической активности.

## Б58. ОТ ЛИНИЙ-ГАПЛОИНДУКТОРОВ К ГЕНАМ И БЕЛКАМ ГИНОГЕНЕЗА КУКУРУЗЫ

Чумаков М.И.,<sup>1</sup> Фадеев В.В.,<sup>1</sup> Фадеева Ю.В.,<sup>1</sup> Моисеева Е.М.<sup>1</sup>

*1. Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук», проспект Энтузиастов, 13, 410049, Саратов, Россия*

**Ключевые слова:** гены и белки гиногенеза, спонтанный эмбриогенез, кукуруза

При партеногенезе (гиногенезе) у растений, в частности у кукурузы, развитие яйцеклетки происходит с низкой частотой без оплодотворения. Линии-гаплоиндукторы с высокой частотой гаплоиндукции могут использоваться в современных сельскохозяйственных биотехнологиях для получения гомозиготных линий. В докладе приведена более 75-летняя история получения линий-гаплоиндукторов кукурузы мировой и саратовской селекции. Описаны молекулярные механизмы, приводящие к гиногенезу и получению гаплоидных зародышей у кукурузы. Целью работы является исследование генов гиногенеза у кукурузы с целью последующего редактирования и получения линий-гаплоиндукторов и гомозиготных линий. Охарактеризованы гены гиногенеза разного типа. В частности, проведен анализ спонтанных мутаций в секвенированных нами нуклеотидных последовательностях генов *Zm\_Mtl/Nld/Pla1*, *Zm\_Dmp7/Duf679*, *Zm\_CenH3*, *Zm\_Bbm1* у гаплоиндуцирующих и обычных линий кукурузы [1, 2]. С помощью программы AlphaFold3 получены и проанализированы трехмерные (3D) модели белков гиногенеза кукурузы (рис. 1, [3]).

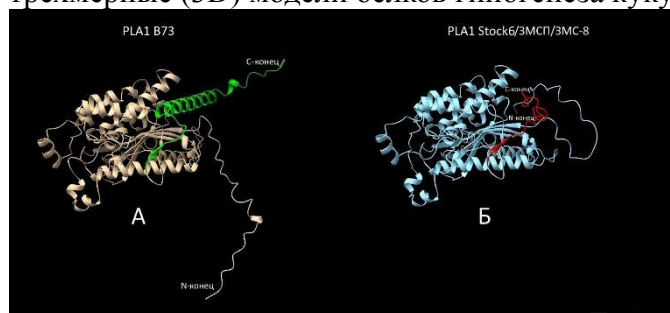


Рис. 1 Трехмерная модель белка кукурузы MTL/NLD/PLA1 референсной линии B73 (А) и гаплоиндуцирующих линий Stock 6/3MC-8/3MC-П (Б). После четырехнуклеотидной вставки две  $\alpha$ -спирали (А, зеленый цвет) заменены неструктурированным участком (Б, красный цвет).

Показано какие замены и вставки нуклеотидов приводит к изменению 3D конформации и функций белков гиногенеза у гаплоиндуцирующих линий кукуруз [3].

### Список литературы

1. Моисеева Е.М., Фадеев В.В., Красова Ю.В., Чумаков М.И. Анализ мутаций генов эмбрио и эндоспермогенеза кукурузы // Генетика 2023. Т. 59. No. 9. С. 1090–1093. DOI: 10.31857/S0016675823090084
2. Моисеева Е.М. с соавт.. Сравнительный анализ мутаций генов гиногенеза кукурузы // Генетика. 2024. Т.60. №10. С. 47–55. DOI: 10.31857/S0016675824100047
3. Фадеев В.В., Фадеева Ю.В., Моисеева Е.М., Чумаков М.И. Конформация моделей белков при мутациях в генах, ассоциированных с гаплоиндукцией и эмбриогенезом кукурузы // Генетика. 2025. Т. 61. № 3. С. 32–39. DOI: 10.31857/S0016675825030049

## Б59. СВОЙСТВА ГЕТЕРОКАНАЛОВ Kv(1.1-1.2)<sub>2</sub> С ПАТОГЕННОЙ МУТАЦИЕЙ T226R В СУБЪЕДИНИЦЕ Kv1.1

Шматин И.И.<sup>1,2\*</sup>, Игнатова А.А.<sup>1</sup>, Ефременко А.В.<sup>1</sup>, Абрамочкин Д.В.<sup>2,3</sup>, Джуманиязова И.<sup>2</sup>, Кирпичников М.П.<sup>1,2</sup>, Феофанов А.В.<sup>1,2</sup>, Некрасова О.В.<sup>1</sup>

1. Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

2. Биологический факультет МГУ, Москва, Россия

3. Институт физиологии ПИМУ, Москва, Россия

\*shmatinva@gmail.com

**Ключевые слова:** калиевые каналы Kv1.1/Kv1.2, мутация T226R, флуоресцентная микроскопия, пэтч-кламп

Kv1.1 является одной из самых распространенных  $\alpha$ -субъединиц в потенциал-зависимых (Kv) каналах в головном мозге [1], которая входит, в основном, в состав гетеротетрамерных каналов совместно с  $\alpha$ -субъединицей Kv1.2. Гетероканалы Kv1.1/Kv1.2 являются важными регуляторами нейронной проводимости, а нарушение их функций приводит к развитию ряда заболеваний. Нами исследованы свойства гетероканалов (Kv1.1-Kv1.2)<sub>2</sub> с мутацией T226R в  $\alpha$ -субъединице Kv1.1 (Kv(1.1m-1.2)<sub>2</sub>), ассоциированной с эпизодической атаксией 1-го типа и некоторыми другими неврологическими нарушениями [2].

Были получены генетические конструкции, кодирующие флуоресцентно-меченые конкатемеры Kv1.1(T226R)-Kv1.2, которые при экспрессии в клетках Neuro-2a, формируют гетероканалы Kv(1.1m-1.2)<sub>2</sub>. Используя сочетание методов пэтч-клампа, конфокальной флуоресцентной микроскопии и Фёрстеровского резонансного переноса энергии, были изучены функциональные характеристики этих каналов в сравнении с гетероканалами дикого типа Kv(1.1-1.2)<sub>2</sub>.

Установлено, что мутация T226R значительно замедляет активацию (в ~8 раз) и деактивацию (в ~1,5 раза) гетероканалов, сдвигает потенциал активации в положительную сторону на ~24 мВ и снижает плотность тока на мембране на ~45%. При этом формирование комплексов между субъединицами Kv1.1(T226R) и Kv1.2 не нарушается, однако наблюдается задержка выхода и общее снижение экспрессии каналов на плазматической мембране.

Полученные данные свидетельствуют, что мутация T226R вызывает дисфункцию электрических свойств гетероканала Kv(1.1m-1.2)<sub>2</sub>, а также нарушает внутриклеточный трафик и встраивание гетероканалов в мембрану клетки. Влияние гетероканалов, несущих мутацию T226R, на патогенез неврологических заболеваний, по-видимому, определяется снижением чувствительности клеток к умеренной деполяризации мембраны, ведущей к повышенной возбудимости нейронов.

Исследование поддержано Российским научным фондом (проект № 25-24-00191).

### Список литературы

1. Pinatel, D. et al. Assembly and Function of the Juxtaparanodal Kv1 Complex in Health and Disease // Life (Basel). – 2020. – Vol. 11. – P. 1–22.
2. Paulhus, K. et al. Clinical Spectrum of KCNA1 Mutations: New Insights into Episodic Ataxia and Epilepsy Comorbidity // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21. – P. 2802.



## **Б60. УСИЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГИБРИДНОГО БЕЛКА НА ОСНОВЕ ЦИТОКИНА TRAIL ЗА СЧЕТ СПЕЦИФИЧНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С РЕЦЕПТОРАМИ DR5, VEGFR2 и FGFR1**

Юань Ц.1\*, Исакова А.А.1,2, Куковьякина Е.В.2, Федулова А.С.1, Авакянц А.В.1,2, Шайтан А.К.1, Долгих Д.А.1,2, Кирпичников М.П.1,2, Гаспарян М.Э.2, Яголович А.В.1

1. Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

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

\* [zijian0820@163.com](mailto:zijian0820@163.com)

**Ключевые слова:** TRAIL, DR5, FGFR1, биспецифичный белок, терапия опухолей

Разработка таргетных молекул, активирующих сигнальный путь рецептора смерти DR5, является перспективной стратегией лечения онкологических заболеваний. Также известно, что блокирование рецепторов из семейства тирозинкиназ VEGFR2 и FGFR1 способствует подавлению клеточной пролиферации и ангиогенеза в солидных опухолях. В работе была разработана серия гибридных белков на основе мутантного варианта цитокина TRAIL DR5-B, селективного к рецептору DR5, с эффекторными пептидами SRH и p48, специфично блокирующими рецепторы VEGFR2 и FGFR1, соответственно [1]. Молекулярное моделирование гибридных белков показало, что домен DR5-B сохраняет стабильность, при этом пептиды формируют с ним неспецифические контакты. Рекомбинантные белки DR5-B, DR5-B-p48, SRH-DR5-B и SRH-DR5-B-p48 были получены путем экспрессии в *E. coli* и очищены с помощью металл-хелатной и ионообменной хроматографии. С помощью иммуноферментного анализа было показано сродство гибридных белков к целевым рецепторам DR5, VEGFR2 и FGFR1 в наномолярном диапазоне. Двойной гибридный белок SRH-DR5-B-p48 обладал повышенной цитотоксичностью по сравнению с DR5-B, DR5-B-p48 и SRH-DR5-B на различных линиях опухолевых клеток, экспрессирующих рецепторы-мишени DR5, VEGFR2 и FGFR1, при этом не проявляя токсичности на нормальных клетках. Таким образом, SRH-DR5-B-p48 является перспективным кандидатом для лечения солидных опухолей различной этиологии. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 24-14-00250.

### **Список литературы**

1. Yagolovich A.V. et al. Novel fusion protein based on DR5-specific TRAIL variant with enhanced antitumor properties // Biochemistry (Moscow). 2025. Vol. 90. P. 1277–1287.

# Организаторы конференции



Московский  
государственный  
университет  
имени М.В. Ломоносова



Биологический  
факультет МГУ  
имени М.В. Ломоносова



Кафедра  
Биоинженерии  
Биологического факультета МГУ

## ГЕНЕРАЛЬНЫЕ СПОНСОРЫ

**BIOCAD**

Biotechnology Company



Инновации в биофармацевтике

## ПАРТНЕРЫ



## СПОНСОРЫ

**helicon**



ТехноИнфо  
Технологии открытий



Lumiprobe  
Life science solutions



ДИА•М  
современная лаборатория

Школа-конференция проводится в рамках выполнения исследовательской программы в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2030 годы (соглашение #075-15-2025-475 «Разработка комплексных подходов для диагностики, моделирования и терапии заболеваний с использованием генетических технологий»)