***Отчет отдела молекулярных основ онтогенеза за 2020 год.***

**Реферат**

1. Наиболее важные исследования в области биотехнологии стероидов в последнее время проводятся с использованием технологий рекомбинантных ДНК. Ключевым ферментом стероидогенеза в организме млекопитающих является цитохром P450scc (CYP11A1), катализирующий трансформацию холестерина в прегненолон – предшественник всех стероидных гормонов. В комплексе с двумя белками-партнерами, адренодоксином (Ad) и адренодоксинредуктазой (AdR), он образует сложно организованную холестерингидроксилазную/лиазную (ХГЛ). Ранее мы осуществили функциональную реконструкцию ХГЛ системы быка в клетках бактерий и дрожжей, но ХГЛ активность полученных штаммов оказалась довольно низкой. В 2020 году мы продолжили исследования в этом направлении с целью получения более эффективных штаммов. Для этого мы осуществили реконструкцию ХГЛ в дрожжах в форме само-расщепляющегося полипротеина P450scc-2A-AdR-2A-Adx (CHL-2A). По результатам этой серии исследований опубликована статья в высокорейтинговом журнале “Journal of Biotechnology”.

Мы продолжили работу по оптимизации системы ХГЛ в клетках бактерий *E. coli* посредством экспрессии генов, кодирующих белки-транспортеры холестерина, а также по анализу экспрессии кДНК белков этой системы в клетках бактерии *Methylobacterium mextorquens*. Для этого мы сконструировали плазмиды, кодирующие химерные белки цитохрома P450scc, слитого с флуоресцентным репортерным белком. Совместно с группой проф. Шкуматова (НИИ ФХП, БГУ, Минск, Беларусь) мы продолжили исследования взаимодействия флуоресцентных стероидных субстратов с клетками микроорганизмов. Доказана способность данных субстратов попадать в клетки и участвовать в процессах транспортировки стеролов и метаболизме дрожжей.

2. В отличие от животных, растения неподвижны и не могут активно избегать действия агрессивных факторов окружающей среды, таких как патогенные микроорганизмы, насекомые-вредители, паразитические растения, экстремальные температуры, засухи и многие другие. Основным способом адаптации к таким факторам у растений служит фенотипическая изменчивость, основанная на механизмах эпигенетической памяти. Растение с одним и тем же генотипом может иметь разные фенотипические характеристики в разных экологических нишах. Например, обитающие в холодных северных и более теплых южных регионах Швеции растения арабидопсиса различаются характером метилирования генома по асимметричным сайтам CHH. Известно немало случаев успешного «захвата» новых географических регионов растениями генетически однородных популяций. Например, растения горца японского успешно «оккупировали» многие территории в Европе и США. Показано, что в основе их успешной адаптации к условиям различных экологических ниш (болота, побережья, обочины дорог) лежат устойчивые изменения эпигенома при практически неизменном геноме. Эти наблюдения могут служить яркой иллюстрацией еще одной особенности растений, разительно отличающей их от животных – сильно выраженной способности передавать эпигенетические изменения следующим поколениям. Удивительным примером такой передачи на протяжении многих последовательных поколений является мутация, изменяющая симметрию цветка с билатеральной на радиальную, у льнянки обыкновенной. Многие годы ее считали классической менделевской мутацией. Лишь относительно недавно было установлено, что в действительности она является эпимутацией – стабильной инактивацией гена *Lcyc* в результате спонтанного метилирования его промотора. Другой яркий пример – стабильная активация гена *Xa21G* у риса с помощью деметилирующего агента 5-аза-дезоксицитидина. В результате возникла линия растений, устойчивых к патогену *Xanthomonas oryzae*. Весьма разрушительным для сельского хозяйства природным фактором являются паразитические растения. Удивительно, что чувствительность к заражению растениями-паразитами варьирует не только между разными видами, но и между разными растениями одного и того же вида. Существуют и расы растений-паразитов одного вида, специфические для определенных растений-хозяев. По-видимому, в ходе взаимной адаптации у растений-паразитов происходит развитие изощренных механизмов преодоления резистентности растений-хозяев, а у последних – столь же изощренных механизмов устойчивости. Показано, что эти механизмы включают обоюдный обмен специфическими эффекторными молекулами, такими как малые РНК, мРНК и белки. В некоторых растениях-паразитах после инвазии наблюдается появление молекул РНК растения-хозяина, причем в наборах этих РНК явно проявляется определенная избирательность. Транслируются ли чужие мРНК в растении-паразите, неясно, но определенно показано, что интерферирующие РНК растения-хозяина могут подавлять экспрессию генов растения-паразита. Напрашивается идея использовать этот механизм для создания устойчивых к заражению сельскохозяйственных растений. Эти и многие другие примеры позволяют рассматривать эпигенетическую память как особый механизм долговременной адаптации растений, в масштабах целых популяций, к изменяющимся условиям окружающей среды, в том числе – агрессивным биотическим и абиотическим факторам. Мы подробно проанализировали роль различных эпигенетических систем (метилирование ДНК, модификации гистонов, малые и длинные некодирующие РНК) в адаптации растений к биотическим и абиотическим стрессам. В дикой природе эти эпигенетические системы в значительной степени обеспечивает способность растений приспосабливаться к разным экологическим нишам и успешно переживать резкие изменения условий существования, такие как экстремальные температуры, засухи, нашествия насекомых-вредителей и многие другие. В сельском хозяйстве понимание тонких деталей их функционирования необходимо для создания сортов растений с повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды.

3. Парабиозом называют хирургическое объединение двух организмов, приводящее к образованию у них общей системы кровообращения. Эта модель используется для выяснения возможных физиологических и биохимических эффектов различных факторов системной среды. В моделях гетерохронного парабиоза объединение кровеносных систем молодого и старого организмов позволяет изучать эффекты факторов молодой системной среды на ткани старого организма и наоборот. Эта давно известная и незаслуженно забытая на многие годы экспериментальная парадигма вновь стала широко использоваться в последние годы после того как в нескольких исследованиях было обнаружено омолаживающее действие молодой системной среды на ткани старого организма. Важным вопросом, который все еще остается без ответа, является природа молекул-переносчиков этого омолаживающего действия.

4. Показано, что при старении в клетках млекопитающих происходят изменения в характере метилирования ДНК. При этом помимо стохастических изменений, степень метилирования определенных сайтов CpG происходит в четкой корреляции с возрастом. В совокупности метилирование таких сайтов может быть использовано как «эпигенетические часы» для определения биологического возраста. Было предложено множество вариантов эпигенетических часов, основанных на измерении степени метилирования индивидуальных сайтов CpG. Для количественного анализа метилирования ДНК разработано несколько методов, наиболее надежные из которых основаны на бисульфитной обработке ДНК. Мы разработали протокол измерения степени метилирования индивидуальных сайтов CpG в последовательностях-мишенях, основанный на прямом секвенировании продуктов ПЦР-амплификации целевых участков ДНК после бисульфитной конверсии.

5. Высокие концентрации соли в почвах заметно снижают продуктивность пшениц. Поэтому весьма актуальной остается задача по созданию тест-систем для эффективной идентификации и селекции устойчивых к солевому стрессу генотипов. Для выяснения характеристик, определяющих реакции растений на солевой стресс, мы сравнивали генотипы сортов пшеницы, имеющих разную чувствительность к хлориду натрия – Оренбургская 10 и Оренбургская 22. Для этого с помощью методов световой и электронной микроскопии исследовали структурно-функциональные характеристики клеток корней в проростках пшеницы на предмет поиска цитологических маркеров для тестирования чувствительности к солевому стрессу. Ответы растений на солевой стресс оценивали по биометрическим данным, интенсивности дыхания, накопления активных форм кислорода (АФК) и окрашиванию митохондрий, а также по изменению жизнеспособности клеток колеоптиля проростков. У чувствительного генотипа Оренбургская 10 солевой стресс приводит к выраженному окислительному повреждению клеток корня, в то время как у резистентного генотипа Оренбургская 22 такие повреждения были минимальными. Это коррелировало с высоким уровнем экспрессии митохондриальной супероксид-дисмутазы (*MnSOD*) в корнях сорта Оренбургская 22. Идентификация и функциональный анализ цитологических и молекулярных маркеров устойчивости к солевому стрессу послужит основой для дальнейшего изучения соле-устойчивости пшениц.

6. Показано, что дипептиды глицил-глицин (GlyGly) и глицил-аспарагиновая кислота (GlyAsp), а также аминокислота глицин (Gly) стимулируют рост и развитие каллусов и проростков табака (Nicotiana tabacum L.) в концентрации 10–7 М. Все три вещества влияют на клеточную дифференцировку и процессы морфогенеза в каллусах, модулируюя экспрессию генов семейств KNOX и GRF. Профили индукции или репрессии генов одним и тем же пептидом различаются между каллусами и проростками.

7. Мы исследовали эффекты тетрапептида AEDL (AlaGluAspLeu) на структуру хроматина в растениях табака Nicotiana tabacum L. При культивировании растений в присутствии 10−7 M пептида AEDL доля конденсированных доменов хроматина уменьшалась с 45% до 25%. Эксперименты с гашением флуоресценции меченых флуоресцеин-изотиоцианатом показали, что линкерный гистон H1 и комплексы гистонов H3 и H1 с DNA связываются с AEDL в эквимолярной пропорции. Мы обнаружили, что пептид связывается с N-концевым остаткам лизина в молекуле гистона H1 и 36-м остатком лизина в молекуле гистона H3. Эти взаимодействия приводят к декомпактизации участков хроматина и переходу их в транскрипционно активную конфигурацию.

8. Эффективность терапии фитоэстрогенами на развитие атеросклероза изучалась в рандомизированном двойном слепом исследовании на когортах женщин в раннем (40-55 лет) и позднем (60-69 лет) постменапаузальном периоде. За два года терапии фитоэстрогены не оказывали существенного влияния на рост толщины средней интимы общей каротидной артерии у женщин раннего постменапаузального периода, но заметно замедляла его у женщин позднего постменапаузального периода.

9. В 6-месячном рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании изучали эффективность натурального растительного препарата Инфламината (ягоды черной бузины, фиалка, цветки календулы) при хроническом обструктивном воспалении легких. По данным экспериментальных исследований Инфламинат обладает антицитокиновой и противовоспалительной активностью. Показано, что 6-месячный курс препарата заметно улучшает клиническую картину болезни. Побочных эффектов не обнаружено.

**Введение**

1. Потребность в стероидных лекарственных препаратах увеличивается с каждым годом, поэтому работы по конструированию новых «фабрик в живой клетке» (microbial cell factories) для получения конкретных стероидных лекарственных препаратов чрезвычайно актуальны. Использование трансгенных микроорганизмов традиционно используется для синтеза стероидных соединений. Важной и интересной задачей в этой области по-прежнему является развитие методологии реконструкции стероидогенных систем млекопитающих, анализа и оптимизации их функционирования в различных микроорганизмах-хозяевах. Однако, для получения микроорганизмов, продуцирующих определенные стероиды с высоким выходом, необходимо решать задачи, имеющие фундаментальный характер, такие как регуляция экспрессии генов, изменение топогенеза белков, изменение направления или конструирование новых метаболических путей в клетке и другие. Благодаря появлению новых «инструментов» метаболической инженерии (новые промоторы, терминаторы, эписомальные и интегративные системы экспрессии, технологии быстрой модификации штаммов и др.), в биотехнологии стероидов в последнее время все больше используются рекомбинантные технологии.

Ключевым ферментом каскада стероидогенеза в организме млекопитающих является цитохром P450scc (CYP11A1). Он катализирует начальную лимитирующую стадию стероидогенеза – трансформацию холестерина в прегненолон, являющийся единственным соединением-предшественником всех типов стероидных гормонов. Для функционирования цитохрома Р450scc необходимы два белка-партнера – [2Fe-2S] ферредоксин, называемый адренодоксином (Ad), и NADPH-зависимая флавиновая редуктаза – адренодоксинредуктаза (AdR), с которыми он образует сложно организованную холестерингидроксилазную/лиазную (ХГЛ) систему. Ранее нами была осуществлена функциональная реконструкция ХГЛ системы быка в клетках бактерий и дрожжей, однако полученные рекомбинантные штаммы имели довольно низкую ХГЛ активность. В 2020 году мы продолжали исследования с целью получения штаммов микроорганизмов, способных эффективно трансформировать холестерин в прегненолон.

2. Растения обитают в постоянно меняющейся среде, которая часто неблагоприятна и даже враждебна. Будучи неподвижными организмами, растения не могут активно избегать воздействия многочисленных агрессивных факторов. Вместо этого они проявляют высокую фенотипическую пластичность, включающую быстрые ответы на агрессивные факторы и адаптацию к изменяющимся условиям внешней среды. В основе этой фенотипической пластичности лежат изменения в экспрессии генов. Поскольку эпигенетические сигналы контролируют экспрессию генов, эпигенетические изменения могут быть ключевым фактором в ответах растений на стрессы и их адаптации к условиям окружающей среды. Одной из ключевых особенностей организации эпигенетических систем у растений является высокая способность к передаче эпигенетических сигналов между последовательными поколениями растений. По-видимому, эта особенность позволяет растениям выживать в устойчиво изменившихся условиях внешней среды и быстро адаптироваться к новым условиям в масштабах времени, слишком коротких для естественного отбора случайных адаптивных мутаций.

3. Парабиоз [от греческих «пара» (по соседству) и «биос» (жизнь)] обозначает объединение двух живых индивидов, которое может быть спонтанным (сиамские близнецы) или искусственным – с помощью особой хирургической операции. За полтора столетия со времени своего изобретения как исследовательского инструмента он был использован в очень разных экспериментах, в особенности для изучения гуморальных факторов, например гипофизарной регуляции половых гормонов. С помощью парабиоза была, например, обнаружена регуляция по механизму отрицательной обратной связи: гонадоэктомия индуцировала гиперсекрецию гонадотропного фактора гипофизом, а инъекция половых гормонов, наоборот, подавляла ее. Аналогично были изучены эффекты инсулина на работу поджелудочной железы, процессы приживания-отторжения при трансплантации тканей, регуляции кровяного давления, регенерации печени, аллергии и иммунитета и многие другие.

В принципе, модель парабиоза позволяет ответить на любой вопрос, связанный с действием какого-либо фактора одного парабионта на организм другого парабионта, если этот фактор переносится кровью. В отличие от множества популярных экспериментальных моделей, парабиоз представляет собой холистический подход к изучению биологических процессов и заболеваний, включающих изменения на уровне всего организма, например, эффектов диеты и старения. Гетерохронный парабиоз представляет уникальную возможность исследовать эффекты системной среды на процессы старения и долголетие. Объединение молодого и старого организмов увеличивает продолжительность жизни старого, вероятно, благодаря воздействию каких-то факторов молодой системной среды.

4. Метилирование ДНК – наиболее изученная эпигенетическая модификация, играющая важную роль в стабильных изменениях экспрессии генов при клеточной дифференцировке и старении. Для понимания точного места этой модификации среди причин старения необходимо использование простых и точных методов количественного анализа метилирования ДНК для любого набора индивидуальных сайтов CpG. Детекция метилирования ДНК с помощью обработки бисульфитом натрия и последующего секвенирования, обычно называемая бисульфитным секвенированием, де факто стала «золотым стандартом» и широко используется в полногеномных и локальных исследованиях метилирования. Бисульфит натрия вызывает дезаминирование остатков цитозина, превращая их в остатки урацила. Поскольку наличие метильной группы в пятом положении цитозина препятствует такому дезаминированию, эту реакцию можно использовать для того чтобы различать остатки цитозина и 5-метилцитозина. Дезаминирование цитозина бисульфитом натрия включает четыре важные стадии: (1) денатурацию ДНК; (2) реакцию бисульфита с двойной связью 5–6 цитозиновых остатков с образованием сульфонатов; (3) гидролитическое дезаминирование сульфонатов цитозина с образованием сульфонатов урацила; и (4) удаление сульфонатных групп щелочной обработкой. Обработанную таким образом ДНК можно анализировать разными методами, такими как глубокое секвенирование, гибридизация на микрочипах, ПЦР-амплификация и другие. Поскольку превращение цитозинов в урацилы нарушает комплементарность цепей ДНК, каждая из нитей должна анализироваться отдельно, например с помощью разных пар праймеров, специфических в отношении верхней и нижней цепи. При ПЦР-амплификации остатки урацила заменяются на остатки тимина, в то время как остатки 5-метилцитозина заменяются на остатки цитозина.

5. В естественных условиях растения часто подвергаются стрессам, таким как засуха, засоление, экстремальные температуры, тяжелые металлы и другие. Такие стрессы сильно влияют на рост и развитие растений. Для большинства культурных растений засоление почвы является неблагоприятным фактором. Соли влияют на физиологические, биохимические и молекулярные функции растений, уменьшая продуктивность и качество многих зерновых культур. Наблюдается устойчивая тенденция к постепенному увеличению засоленности сельскохозяйственных земель, что существенно ограничивает возможности их эксплуатации.

Стрессы приводят к образованию АФК, таких как супероксид анион (O2−), перекись водорода (H2O2), гидроксильный радикал (OH−), пероксильный радикал (HO−) и синглетный кислород (1O2). В результате происходит повреждение макромолекул и клеточных мембран и, в конечном итоге, гибель клеток. В клетках растений продукция АФК контролируется энзиматическими и неэнзиматическими антиоксидантными системами, такими как супероксид-дисмутаза, каталаза, аскорбат-пероксидаза, монодегидроаскорбат-редуктаза, дегидроаскорбат-редуктаза, тиоредоксин и глутатион. Супероксид-дисмутаза является активным «адсорбентом» АФК, катализируя превращение супероксид аниона в перекись водорода, которая в дальнейшем разлагается на нетоксичные молекулы – воду и кислород.

В зависимости от природы металла, взаимодействующего с активным центром, супероксид-дисмутазы подразделяются на четыре типа: FeSOD, MnSOD, Cu/ZnSOD and NiSOD. Они различаются по структуре, субклеточной локализации и чувствительности к различным химическим веществам.

АФК являются побочными продуктами нормального обмена веществ. Они повреждают липиды клеточных мембран, цепи ДНК и ферменты. Условия, способствующие таким повреждениям, обычно называют окислительным стрессом. Например, генерация супероксид анионов происходит в цепях переноса электронов в хлоропластах и митохондриях. Мы изучали ранние признаки оксидативного повреждения в проростках пшениц под действием солевого стресса.

6. Пептиды участвуют в обширной регуляторной сети, контролирующей рост и развитие растений. Большинство исследованных пептидов происходят из неактивных белков-предшественников. Обнаружены также пептиды, образующиеся из функционально активных белков, а также прямой трансляцией коротких открытых рамок считывания. Секретируемые пептиды длиной от 2 до 100 аминокислотных остатков играют важную роль в регуляции межклеточных взаимодействий, физиологических реакциях и ответах на различные факторы внешней среды и сигналы. Мы исследовали влияние двух дипептидов, GlyGly и GlyAsp, а также аминокислоты глицина (Gly) на рост, развитие и экспрессию генов в проростках и каллусах табака.

7. Структура хроматина растений изменяется под действием внешних стрессов, таких как температура, влажность, засоленность почвы, инфекционные агенты. Пептиды являются участниками регуляторных сигнальных путей, контролирующих рост и развитие растений. Короткие пептиды могут изменять экспрессию генов, кодирующих факторы транскрипции, тем самым влияя на процессы роста и развития. В основе этого действия, возможно, лежат эпигенетические механизмы, модулирующие конфигурацию хроматина.Мы исследовали механизмы действия тетрапептида AEDL (AlaGluAspLeu) на уровне хроматина в растениях табака.

8. В развитых странах атеросклероз играет ключевую роль в развитии сердечнососудистых заболеваний – главной причиной смертности. Прогрессирование атеросклероза особенно выражено у женщин в позднем постменапаузном периоде. Для коррекции нарушений здоровья у таких женщин часто используется заместительная гормональная терапия (ГТ), но ее эффективность в отношении сердечнососудистых заболеваний неоднозначна. Исследование в рамках проекта Women’s Health Initiative (WHI) показало негативное соотношение риск/улучшение для ГТ в отношении сердечнососудистых болезней у женщин в поздней постменапаузе. Исследование в рамках проекта ELITE (Early versus Late Intervention Trial of Estradiol) обнаружило значимый положительный эффект ГТ на толщину средней интимы сонной артерии в ранней постменапаузе (≤6 лет после менапаузы), но не в поздней постменапаузе (>10 лет после менапаузы). В исследовании Kronos Early Replacement Study (KEEPS) не удалось обнаружить статистически достоверного эффекта ГТ на развитие атеросклероза и толщину интимы в ранней постменапаузе.

Натуральные растительные препараты широко используются как поддерживающие средства, благодаря минимальному риску побочных эффектов и осложнений при длительном потреблении. Созданы такие препараты и для сердечнососудистых заболеваний. В частности, фитоэстрогены оказывают благоприятное действие в отношении сердечнососудистой системы у женщин в поздней постменапаузе. В нескольких клинических испытаниях у них обнаружены эффекты снижения уровня липидов и гипотензивные, а также снижения уровня глюкозы. Мы исследовали эффекты фитоэстрогенов на толщину средней интимы общей сонной артерии, как показатель развития атеросклероза, у женщин в ранней и поздней постменапаузе.

9. Хроническая обструктивная пневмония (ХОП) – многофакторное заболевание, в котором решающую роль играет системное воспаление. Воспалительный ответ при ХОП определяется активацией эпителиальных клеток и дисфункцией макрофагов в респираторном тракте. В ассоциированном с ХОП хроническом воспалении участвуют многте цитокины. Проваспалительные цитокины, такие как TNF-α и IL-1β, усиливают воспалительный ответ. В легочной ткани пациентов с ХОП повышены концентрации TNF-α и интерлейкинов IL-1α, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10 и IL-12. Показано, что предрасположенность к ХОП зависит от полиморфизмов в генах, кодирующих провоспалительные факторы.

Натуральный антицитокиновый препарат Inflaminat содержит экстракты календулы, бузины и фиалки. Показано, что он обладает выраженной противовоспалительной активностью in vitro, ex vivo и in vivo. В человеческой сыворотке ex vivo он уменьшал провоспалительную активность на 22–38%: добавление Inflaminat’а заметно уменьшало экспрессию TNF-α и IL-1β в первичной культуре макрофагов, индуцированную сывороткой. В модеи асептического воспаления соединительной ткани крыс, индуцированного крио-повреждением, Inflaminat заметно ускорял заживление. В пилотном клиническом исследовании на пациентах с реактивным артритом Inflaminat улучшал позитивную динамику (уменьшал число затронутых суставов и интенсивность боли). Inflaminat обладает клинической противовоспалительной активностью, сравнимой с активностью НПВС. В 6-месячном рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом клиническом исследовании мы изучили эффективность Inflaminat’а при ХОП.

**Основная часть**

1. Недавно мы впервые осуществили реконструкцию ХГЛ системы быка в дрожжах *S. cerevisiae* в форме само-расщепляющегося полипротеина P450scc-2A-AdR-2A-Adx (CHL-2A), используя подход, основанный на использовании2A пептида вирусов, и провели анализ влияния замены неэффективно расщепляющегося второго 2А пептида вируса ящура на разные 2А последовательности и изменения порядка белков-компонентов на эффективность расщепления CHL-2A. В 2020 г., используя полученные модели экспрессии, мы провели анализ активности вариантов CHL-2A, демонстрирующих разную эффективность расщепления. Обнаружено, что активность реконструированных CHL-2A систем не коррелирует с эффективностью расщепления второго линкера CHL-2A. Конструкции CHL-T2A (P450scc-2A, Adx-2A и AdR) и CHL-2Arev (P450scc-2A, AdR-2A и Adx) показали сходную эффективность расщепления (90% и 68%, 91% и 54% – для первого и второго линкеров, соответственно). Результирующая активность системы P450scc при использовании CHL-2Arev была в 2,3 раза выше, чем активность CHL-T2A. Данные указывают, что основным фактором, влияющим на активность CHL-2A системы, является не содержание отдельных белков, а порядок белковых последовательностей в составе 2А-полипротеина.

Известно, что ко-трансляционное расщепление пептида 2A в 2A-полипротеинах приводит к добавлению 18 аминокислот на C-конец вышележащего белка. Так как присутствие 2А-фрагмента на С-конце Adx может потенциально влиять на его структуру или взаимодействие с AdR или P450 (вследствие, например, маскировки сайта связывания или стерических затруднений, ограничивающих образование комплекса), мы выполнили моделирование (MD simulation) для Adx с фрагментом 2A, прикрепленным к его C-концу, как в окисленной, так и в восстановленной формах, которые имитируют его состояния во время образования комплексов с AdR и P450scc, соответственно (работа проведена совместно с Ф. Ореховым и М. Боздаганян, Биологический факультет МГУ). Обнаружено, что 2А-фрагмент не индуцирует изменений в структуре Adx в любом состоянии, но его пространственная ориентация существенно различается. Присоединение пептида 2A не влияет на взаимодействие Adx-P450scc. Напротив, результаты в случае окисленного Adx показали, что фрагмент 2A имеет тенденцию занимать область, перекрывающуюся с интерфейсом связывания для AdR, предполагая, что в этом состоянии фрагмент может стерически препятствовать образованию продуктивного Adx-AdR комплекса, что приводит к снижению каталитической активности всей системы в целом. Следовательно, присутствие пептида 2A, слитого с C-концом белка, может препятствовать сборке и функционированию ферментативного комплекса. Насколько нам известно, это первые данные, показывающие, что эту возможность необходимо учитывать при анализе функционирования многокомпонентных систем, реконструированных с использованием 2A-опосредованной ко-экспрессии. По результатам данной серии исследований опубликована статья в высокорейтинговом журнале “Journal of Biotechnology”.

Мы также продолжили работу по оптимизации активности системы ХГЛ в клетках бактерий *E. coli* посредством экспрессии генов, кодирующих белки-транспортеры холестерина. На базе вектора pET-22b мы сконструировали рекомбинантные плазмиды, кодирующие белки с N-концевой сигнальной последовательностью, адресующей их в периплазму клетки: белки-переносчики холестерина StARD3 (preStARD3) и StARD1, слитые с белком-репортером GFP – preStARD3-GFP и preStARD1-GFP. Оптимальную стратегию клонирования целевых генов мы разработали с использованием программы WinСlone, а конструирование осуществили с использованием клеток *E. coli* Top10. Фрагменты ДНК, кодирующие указанные белки, мы синтезировали с помощью ПЦР-амплификации; при необходимости удаляли терминирующий кодон и вводили сайты рестрикции для клонирования. Соответствие полученных плазмид целевым конструкциям контролировали рестриктазным анализом и секвенированием. Для экспрессии кДНК целевых белков использовали штамм *E. coli* BL21(DE3), предназначенный для работы с системами экспрессии, основанными на активности промотора бактериофага Т7. Анализ лизатов трансформированных клеток с помощью Вестерн-блоттинга показал, что все плазмиды обеспечивают синтез соответствующих гетерологичных белков, но уровни экспрессии белков preStARD1 и preStARD3 существенно различаются. Эти белки семейства START имеют очень близкую первичную и практически одинаковую пространственную структуру, но имеют разную растворимость и стабильность. Вероятно, последнее и объясняет различия в их экспрессии. В отличие от мембранного белка STARD1, растворимый белок STARD3 демонстрирует высокий уровень экспрессии в бактериальных клетках. Оценка уровней экспрессии StARD1-GFP и StARD3-GFP с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против GFP, ECL субстрата и системы ChemiDoc XRS+Imaging показала, что содержание StARD3-GFP почти в 10 раз превышает содержание StARD1-GFP. Фиксированные препараты клеток, включающие синтезированные белки STARD1 и STARD3, слитые с флуоресцентным белком GFP, будут в дальнейшем использованы для проведения экспериментов по определению внутриклеточной локализации рекомбинантных белков с использованием флуоресцентной микроскопии

Мы продолжили работу по анализу экспрессии кДНК белков стероидогенной P450scc-системы быка в клетках бактерии *Methylobacterium mextorquens* AM1. Для этого мы сконструировали плазмиду, содержащую слитые в одной рамке считывания кодирующие последовательности цитохрома P450scc и флуоресцентного репортерного белка GFP. Получен трансформированный этой плазмидой штамм клеток, осуществляющий синтез химерного белка P450scc-GFP. Присутствие в нем P450scc-GFP подтверждено с помощью метода Вестерн-иммуноблоттинга с использованием антител против P450scc и против GFP. Внутриклеточная локализация P450scc в этих клетках в дальнейшем будет изучена с помощью флуоресцентной микроскопии.

Мы продолжили совместную работу с группой проф. Шкуматова (НИИ ФХП, БГУ, Минск, Беларусь) по изучению взаимодействия флуоресцентных стероидных субстратов с клетками микроорганизмов. Мы проверили, способны ли флуоресцентные соединения BANBD и BBNBD (синтезированы белорусскими коллегами) проникать через стенку клеток дрожжей и плазматическую мембрану в аэробных условиях культивирования. В случае BANBD и BBNBD мы обнаружили окрашивание периферических и некоторых внутриклеточных компартментов клеток *S. cerevisiae* и *Y. lipolytica*. При этом окрашивание в клетках *Y. lipolytica* более периферическое, чем в *S.cerevisiae.* Это, вероятно, связано с различиями в их метаболизме. В случае *S. cerevisiae* способность трех синтезированных соединений (BANBD, BBNBD и нефлуоресцентного алкин-меченого PAByne) проникать в клетки дополнительно подтверждена путем мониторинга превращения в 3-O-ацетилированные формы, регистрация которых осуществлялась с помощью ЖХ-МС и HPLC-FLD. Таким образом, продемонстрирована способность данных соединений попадать в клетки и участвовать в процессах транспортировки стеролов и метаболизме дрожжей.

2. Абиотические стрессы у растений включают в основном воздействия экстремальных температур, водный дефицит, избыточное засоление почвы, недостаток питательных веществ и загрязнение почвы токсичными элементами. Для изучения чисто эпигенетических (не обусловленных генетическими факторами) вариаций используются генетически однородные (изогенные) популяции растений. Например, при действии различных стрессов на клонированные апомиктические линии растений одуванчика наблюдается заметное увеличение эпигенетической вариабельности по сравнению с контрольными растениями. Возникающие вариации в значительной степени наследуются в последовательных поколениях растений, но при этом в дочерних растениях часто возникают и новые эпигенетические изменения. По-видимому, возникающие под действием стрессов вариации являются в основном, если не исключительно, стохастичными. Но даже в этом случае они могут способствовать адаптации растений к стрессам, представляя собой материал для естественного отбора адаптивных фенотипов. Холодовой стресс заметно изменяет метаболизм и экспрессию генов у растений. При воздействии низких положительных температур у растений повышается устойчивость к последующему воздействию отрицательных температур – явление, известное как холодовая акклиматизация. Показано, что в формировании эпигенетической памяти, на которой основана холодовая акклиматизация, участвуют различные эпигенетические системы, такие как РНК-зависимое метилирование ДНК (RdDM) и метилирование гистона H3 по 27-му остатку лизина (H3K27me3 – система PRC2). Аналогично адаптация к высоким температурам и ответы на тепловой шок зависят как от метилирования ДНК (RdDM), так и от модификаций гистонов (ацетилирования – H3K9Ac и метилирования – H3K4me3). Аналогичные результаты получены и при исследовании других абиотических стрессов.

Не менее важную роль эпигенетические системы играют в защите растений от биотических стрессов: вирусов, бактерий, грибов, насекомых и даже паразитических растений. Более того, принято считать, что многие эпигенетические механизмы, например пост-транскрипционная генетическая инактивация (сайленсинг), возникли в эволюции именно как средство защиты от чужеродных молекул РНК и ДНК и лишь позднее были «приспособлены» под собственные нужды растений. Как бы то ни было, у современных растений защитные ответы на действие инфекционных агентов (бактерии, паразитические грибы) и вредителей (паразитические нематоды, насекомые, растения) включают обширные изменения в экспрессии генов, регулируемые эпигенетическими системами.

В естественной среде растения часто повторно подвергаются действию одних и тех же неблагоприятных факторов. В эволюции они выработали специфические адаптивные механизмы сохранения памяти о действии стресса в течение некоторого времени после того, как сам стресс уже закончился. В основе этой памяти лежат устойчивые изменения в эпигенетическом состоянии генов, активность которых лежит в основе ответа на стресс. Эти изменения все еще обнаруживаются в течение некоторого периода времени после окончания действия стресс-фактора и нередко даже у дочерних растений, не подвергавшихся данному стресс-фактору. Это информация позволяет растениям быстрее или сильнее отвечать на повторное действие того же самого стресс-фактора и обозначается как стресс-прайминг или стресс-память. Помимо стресс-прайминга у растений часто наблюдается передача эпигенетических изменений между последовательными поколениями растений. Очевидно, эта явление увеличивает способность растений выживать в условиях регулярно повторяющихся стрессов в масштабах целых популяций.

3. Известно, что митотическая активность гепатоцитов падает с возрастом. В модели гетерохронного парабиоза у мышей митотическая активность гепатоцитов старой мыши заметно повышалась под действием системных факторов молодой мыши. Аналогично, в скелетной мускулатуре старой мыши гетерохронный парабиоз восстанавливал активность сигнального пути Notch, а также пролиферативную и регенеративную способность сателлитных клеток. Таким образом, молодая системная среда восстанавливала молодой профиль активности сигнальных путей в старых прогениторных клетках.

Как и большинство тканей, нервная система млекопитающих с возрастом постепенно утрачивает способность к регенерации, например, ремиелинизации нервных волокон. Отчасти это объясняется действием системной среды, но также и эпигенетическими изменениями в клетках-предшественниках олигодендроцитов. В модели гетерохронного парабиоза число пролиферирующих клеток-предшественников олинодендроцитов у старого парабионта заметно возрастало, а сама ремиелинизация – улучшалась. Следовательно, молодая системная среда не просто способствовала ремиелинизации как таковой, но и восстанавливала способность прогениторных клеток дифференцироваться в олигодендроциты.

У взрослых мышей области активного нейрогенеза ограничены субвентрикулярной зоной латеральных желудочков и субгранулярной зоной гиппокампа. В модели гетерохронного парабиоза количество вновь образующихся нейронов в этих зонах у старой мыши увеличивается. а у молодой уменьшается. Было показано, что одним из факторов, вызывающих уменьшение активности зон нейрогенеза с возрастом, является хемокин CCL11. Его концентрация в плазме крови и церебро-спинальной жидклсти постепенно увеличивается с возрастом, как у мышей, так и у людей. Число шипиков на дендритах зернистых нейронов зубчатой фасции у старого парабионта возрастает, а синаптическая пластичность улучшается. Под действием молодой плазмы наблюдается также улучшение когнитивных функций у старых мышей. Следовательно, определенные молекулярные изменения системной среды с возрастом могут, по крайней мере, отчасти, объяснять возрастное падение нейрогенеза, синаптической пластичности и когнитивных функций.

Было показано, что уменьшение активности нейрогенеза в гиппокампе мышей с возрастом и сопутствующее ему ухудшение когнитивных функций могут быть обусловлены утратой активности ДНК-деметилазы Tet2 и уровня 5-гидроксиметилцитозина (hm5C). В модели гетерохронного парабиоза у старого парабионта активность Tet2 повышалась. Учитывая, что преобладающей тенденцией возрастного изменения метилирования ДНК в мозге является гиперметилирование ассоциированных с промоторами CG-островков, реактивация деметилазы Tet2 вполне может быть частью омолаживающего действия системной среды.

Среди болезней преклонного возраста, сердечнососудистые определенно являются самыми распространенными. В модели гетерохронного парабиоза молодая системная среда явно уменьшала выраженность сердечной гипертрофии у старой мыши. Одновременно уменьшались и средние размеры кардиомиоцитов. Следовательно, молодая системная среда возвращала гипертрофический клеточный фенотип старого сердца к нормальному фенотипу, характерному для молодого сердца.

Под действием молодой системной среды в моделях гетерохронного парабиоза наблюдалось ускорение заживления переломов костей и стимуляция дифференцировки остеобластов у старого парабионта. Одним из факторов, ответственных за этот омолаживающий эффект, оказались клетки линии моноцитов-макрофагов. При повреждении костной ткани они рекрутируются к раневому участку, где претерпевают фенотипические и функциональные изменения, координирующие процесс заживления.

В некоторых из вышеописанных исследований были получены данные о возможной роли фактора GDF11 как переносчика омолаживающих эффектов молодой системной среды. Однако, они были оспорены в ряде других исследований. Наиболее надежными представляются данные о роли GDF11 как стимулятора нейрогенеза и когнитивных функций.

В мышечной ткани старых парабионтов под действием молодой системной среды изменялись концентрации около 70 переносимых кровью белков. Многие из них обладают про-миогенной активностью и могут действовать синергично на старую мышечную и другие ткани. Например, лептин оказывает обширное действие на гормональные системы, в том числе, контролирующие репродуктивные функции и обмен веществ. Он оказывает многочисленные омолаживающие эффекты. Лептин взаимодействует с окситоцином, оказывая положительное влияние на состояние мышц, костей и мозга и уменьшая выраженность ожирения. Активность лептина и окситоцина уменьшается с возрастом. не исключено. что это является одним из ключевых аспектов старения, уменьшаемых при гетерохронном парабиозе.

4. Для количественного статистического анализа метилирования ДНК продукты ПЦР-амплификации обычно клонируют и множество индивидуальных субклонов каждого целевого фрагмента секвенируют. Степень метилирования каждого сайта определяется по соотношению субклонов, в которых этот сайт метилировани (остаток цитозина при секвенировании) и неметилирован (остаток тимина при секвенировании). Мы прямо секвенируем ПЦР-фрагменты, содержащие многочисленные копии индивидуальных конвертированных молекул ДНК. Степень метилирования каждого цитозинового остатка при этом определяется по соотношению площадей пиков цитозина и тимина в соответствующей позиции выдаваемой секвенатором электроферограммы.

Критической стадией бисульфитного анализа метилирования является полная конверсия остатков неметилированных цитозина в урацилы. Для этого ДНК инкубируют в присутствии высоких концентраций бисульфита натрия при высокой температуре и низком значении pH. Эти жесткие условия приводят к значительной фрагментации ДНК и большим потерям на последующих стадиях десульфонирования и очистки. Использование набора Qiagen EpiTect bisulfite kit позволяет достичь полной (>99%) конверсии неметилированных остатков цитозина за 6 часов, используя от 1 нг до 2 мкг ДНК. При этом использование особого защищающего ДНК буфера позволяет минимизировать фрагментацию ДНК, а использование программы термоциклинга обеспечивает высокую эффективность всех стадий бисульфитной конверсии. Стадия десульфонирования включена в простую процедуру очистки ДНК на колонке.

Критическими стадиями являются дизайн праймеров для ПЦР-амплификации и сама амплификация. Поскольку бисульфитная конверсия ДНК практически уменьшает четерех-буквенный (ATGC) алфавит ДНК до трехбуквенного (ATG) (не считая минорных остатков 5-метилцитозина), шансы неправильной гибридизации праймеров заметно увеличиваются. Мы используем вложенные пары праймеров и ПЦР-амплификацию в два раунда, что позволяет преодолеть проблемы низкого выхода и неспецифической амплификации. Замечено, что продукты амплификации после первого раунда ПЦР часто едва заметны, тогда как после второго раунда они обычно четкие и интенсивные. Наиболее популярным сервисом по конструированию праймеров для амплификации обработанной бисульфитом ДНК является MethPrimer, но мы предпочитаем веб-сервис BiSearch, позволяющий конструировать хорошие праймеры и тестировать их in silico на предмет возможной амплификации нецелевых последовательностей в обработанных бисульфитом геномах наиболее популярных модельных организмов. Этот сервис свободно доступен для некоммерческого использования по адресу http://bisearch.enzim.hu. Он позволяет конструировать праймеры для нативной и обработанной бисульфитом ДНК и сам осуществляет конверсию цитозинов в тимины in silico. При этом сервис позволяет выбрать наилучшие пары праймеров для каждой из цепей ДНК, ранжируя их по наиболее существенным для успешной амплификации параметрам. При конверсии in silico все цитозины вне сайтов CpG считаются неметилированными, а содержащие сайты CpG участки, по возможности. исключаются. При поиске оптимальных пар праймеров учитывается их возможная гибридизация с каждой из нитей ДНК и взаимное расположение участков гибридизации. Все потенциальные продукты ПЦРзамплификации показываются с деталями их локлизации в геноме. Программа показывает еще некоторые параметры, важные для успешной амплификации и анализа метилирования, например количество потенциально метилируемых сайтов CpG в ПЦР-фрагменте. Мы обычно выбираем две «вложенные» пары праймеров для каждого целевого фрагмента ДНК. ПЦР-амплификацию на приборе Bio-Rad CFX96 осуществляем в присутствии интеркалирующего красителя SYBR green в два раунда: на первом используем внешнюю пару праймеров и обработанную бисульфитом ДНК, на втором – внутреннюю пару праймеров и 2-мкл порцию продуктов первого раунда в качестве матрицы. Продукты амплификации очищаем препаративным электрофорезом в 2%-ном геле агарозы. Они хорошо заметны под длинно-волновым ультрафиолетом (310 nm), благодаря флуоресценции SYBR Green. Целевые продукты амплификации из вырезанных участков агарозного геля выделяем с помощью набора Qiagen QIAquick gel extraction kit.

5. Солевой стресс замедлял рост корней и стеблей обеих исследованных пшениц и изменял многие их морфологические характеристики. В обоих сортах пшеницы солевой стресс индуцировал массовую гибель клеток в колеоптиле, но в случае устойчивого к соли сорта процент мертвых клеток был существенно ниже. Аналогично, число функционально неактивных митохондрий в клетках корней чувствительного сорта при действии солевого стресса было существенно выше, чем в аналогичных клетках резистентного сорта. При культивировании на среде со 150 мМ NaCl, уровень экспрессии *MnSOD* в листьях чувствительного сорта удваивался, а в корнях снижался в два раза. В листьях устойчивого сорта уровень экспрессии *MnSOD* не изменялся, а в корнях был выше, чем в листьях.

6. Мы обнаружили, что дипептиды GlyGly и GlyAsp и аминокислота глицин в концентрациях 10–7 M стимулируют формирование каллусов табака и накопление их массы, а также регенерацию и формирование листьев. Регенеранты, полученные из каллусов на среде с пептидами, имели массу на 35-90% больше, чем полученные на контрольной среде. Формирование листьев на среде с пептидами начиналось на 11-12 день культивирования, а на контрольной среде – на 14-15 день. Самым активным стимулятором формирования каллусов оказался GlyGly. На средах с Gly и GlyGly регенеранты были более крупными и имели более крупные листья, чем в контроле. На среде с GlyAsp наблюдался противоположный эффект: листья были на 30% меньше, чем в контроле. Таким образом, нейтральные Gly и GlyGly стимулировали образование больших листьев, а кислый дипептид GlyAsp – нет. GlyAsp и GlyGly стимулировали развитие проростков табака, в том числе – их корневой системы. Длина главного корня увеличивалась примерно на 40% по сравнению с контролем, и появлялись новые боковые корни. Высота проростков при этом увеличивалась примерно на 15%, а общая масса – на 40%.

Гены семейства GRF кодируют белки, взаимодействующие с ДНК: ДНК-апуриновую/апиримидиновую лигазу (GRF1), ДНК-топоизомеразу 3α (GRF2), 3',5'-экзонуклеазу (GRF3) и эндонуклеазу 8 (GRF4). Эти гены экспрессируются в регенерантах существенно активнее, чем в проростках. Оба пептида и глицин подавляли экспрессию генов GRF2 и GRF1 в регенерантах, но усиливали экспрессию генов GRF3 и GRF4. В проростках они действовали несколько иначе: также усиливали экспрессию GRF3 и GRF4, но практически не влияли на экспрессию GRF2. Экспрессия гена GRF1 не изменялась под действием GlyGly и Gly, но почти удваивалась под действием GlyAsp. GlyGly, GlyAsp и Gly также влияли на экспрессию генов семейства KNOX, играющих важную роль в развитии листа.

7. Тетрапептид AEDL в концентрации 10−7 M стимулировал образование каллусов и формирование листьев. Общая масса каллусов увеличивалась примерно на 80% по сравнению с контролем. К тому же, для регенерантов, выросших в присутствии пептида, были характерны более крупные квадратные листовые пластинки. Формирование листьев у них начиналось раньше, чем в контроле (на 11–12 и 14–15 день, соответственно). Мезофильные клетки развивающихся листьев в регенерантах имели выраженные домены конденсированного хроматина в нуклеоплазме и по периферии ядра. При выращивании в присутствии тетрапептида доля таких конденсированных доменов уменьшалась примерно на 25%. Анализ экспрессии генов, кодирующих главные гистоновые метилтрансферазы, не выявил значительных изменений под действием тетрапептида. Исследование флуоресценции FITC-меченых гистонов H1 и H3 в присутствии тетрапептида обнаружило прямое взаимодействие между этими гистонами в комплексе с ДНК и тетрапептидом. Очевидно, этим взаимодействием и объясняются эффекты тетрапептида на структуру хроматина.

8. В рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании приняли участие 315 женщин в ранней постменапаузе и 231 женщина в поздней постменапаузе. Все они имели нормальное кровяное давление и липидный профиль. Между реципиентами фитоэстрогена и плацебо не было статистически достоверных различий в таких клинических и лабораторных параметрах как возраст, уровень ФСГ (FSH), кровяное давление, ИМТ (BMI), уровеньобщего холестерина, триглицеридов, холестерина в составе липопротеинов высокой и низкой плотности (HDL и LDL). Процент курящих и употребляющих алкоголь в обеих группах был незначительным. За 24 месяца наблюдения не наблюдалось существенных различий в клинических и лабораторных параметрах между группами, принимавшими фитоэстроген и плацебо. Не наблюдалось и неблагоприятных побочных эффектов. Переносимость фитоэстрогена была очень высокой. Перед началом исследования, через 12 и 24 месяцев не наблюдалось статистически достоверных изменений, а также различий между плацебо- и фитоэстроген-группами в толщине интимы у женщин в ранней постменапаузе. У женщин в поздней постменапаузе наблюдалось статистически достоверное увеличение толщины интимы за период наблюдения в группе плацебо, а также статистически достоверное увеличение толщины интимы в группе плацебо по сравнению с группой фитоэстроген. Эти различия в скорости развития атеросклероза между женщинами ранней и поздней постменапаузы можно объяснить механизмами старения сосудов, включающими хроническое воспаление, оксидативный стресс, дисфункцию митохондрий, клеточную сенесценцию и геномную нестабильность.

9. В исследовании участвовало 60 пациентов мужского пола, по 30 в Inflaminat- и контрольной группах, все – курящие, в возрасте от 42 до 67 лет, с ХОП 2-й стадии (умеренно тяжелой). В первые три месяца существенных изменений в клинических параметрах в обеих группах не наблюдалось. Через 6 месяцев в группе, получавшей Inflaminat, выраженность клинических симптомов ХОП (одышка, кашель, отделение мокроты) заметно снижалась. В группе плацебо таких изменений не наблюдалось. Частота серьезных обострений, требующих госпитализации, не изменялась в обеих группах. Объем форсированного выдоха в группе, получавшей Inflaminat, значимо увеличивался, а в группе плацебо не изменялся.

**Заключение**

1. Мы осуществили реконструкцию холестерингидроксилазной/лиазной (ХГЛ) ферментативной системы быка в клетках дрожжей *S. cerevisiae* в форме само-расщепляющегося полипротеина. Исследование активности разных вариантов этой системы показало, что она определяется, главным образом, порядком индивидуальных белковых последовательностей в составе полипротеина. По результатам данной серии исследований опубликована статья в высокорейтинговом журнале “Journal of Biotechnology”.

Мы сконструировали рекомбинантные плазмиды, обеспечивающие экспрессию белков-переносчиков холестерина в бактериальных клетках *Escherichia coli*. Также получены трансформированные клетки бактерии *Methylobacterium mextorquens*, экспрессирующие белки системы ХГЛ.

Мы показали, что флуоресцентно меченые стероидные субстраты способны проникать в клетки дрожжей *S. cerevisiae* и *Y. lipolytica* и участвовать в процессах транспортировки стеролов и метаболизме.

2. Эпигенетические вариации являются важным механизмом адаптации растений к изменчивым условиям внешней среды. В эволюции у растений сформировались сложные механизмы ответов на различные стрессы. Эти механизмы работают в различных масштабах времени – от быстрых физиологических и метаболических ответов, обеспечивающих выживание индивидуальных растений при действии агрессивного фактора, до долговременных эпигенетических модификаций, способствующих адаптации целых популяций растений к устойчиво изменяющимся условиям среды их обитания. Фундаментальные свойства эпигенетических сигналов – важная роль в регуляции экспрессии генов и способность передаваться между поколениями растений – доказывают, что они представляют собой уникальный эволюционно значимый механизм адаптации. По сравнению с классическими мутациями эпигенетические изменения (эпимутации) происходят гораздо чаще и в принципе обратимы. В эволюционных масштабах времени эпигенетически обусловленные адаптивные фенотипы обычно генетически ассимилируются. Однако, в более коротких масштабах времени они явно играют важную роль в адаптации растений к изменяющимся условиям внешней среды.

3. Исследования с помощью гетерохронного парабиоза направлены на решение фундаментальных вопросов системной регуляции старения клеток и органов. Использование «омных» техник в этой области открыло новые возможности, наиболее важной из которых является идентификация системных факторов, способствующих старению и факторов, препятствующих ему. Эффекторы сигнальных путей Wnt и TGF-β и цитокины с прямым действием на активность стволовых клеток, скорее всего, входят в число таких факторов, но многие другие все еще не идентифицированы. Исследования гетерохронного парабиоза, вероятно, помогут и в понимании эпигенетических механизмов регуляции старения. Молекулярные изменения у парабионтных животных сохраняются некоторое время и после окончания эксперимента, что указывает на эпигенетическое репрограммирование клеток под действием измененной системной среды. Однако, в отличие от ситуации с индукцией плюрипотентных стволовых клеток, при парабиозе не изменяется характер дифференцировки клеток, но повышается их регенеративная активность. Эксперименты с гетерохронным парабиозом доказали, что на уровне целого организма возможно не только замедление старения, но даже омоложение, по крайней мере, в отношении некоторых органов. В дальнейшем будет весьма целесообразным исследовать, как изменяется эпигенетический профиль клеток под действием гетерохронного парабиоза. Как система исследования старения на разных уровнях, парадигма гетерохронного парабиоза имеет огромный потенциал в отношении эпигенетики старения и омоложения.

4. После бисульфитного секвенирования характер метилирования ДНК легко дедуцируется путем сравнения ее исходной последовательности с конвертированной. Каждый неметилированный в исходной последовательности остаток С в конвертированной ДНК превращается в остаток T, тогда как метилированные остатки C в конвертированной ДНК остаются остатками C. В исследованиях метилирования ДНК при старении наиболее информативными являются частично метилированные сайты ДНК. После бисульфитной конверсии степень их метилирования определяется путем секвенирования репрезентативной группы субклонов соответствующей области ДНК. Для надежных количественных расчетов таких клонов должно быть не менее 10–20, что делает анализ дорогим и трудоемким. Поэтому мы предпочитаем секвенировать сами продукты ПЦР-амплификации конвертированной бисульфитом ДНК. Выдаваемые при секвенировании по Сэнгеру электроферограммы позволяют рассчитать степень метилирования каждого остатка цитозина по соотношению площадей пиков цитозина и тимина в соответствующей позиции. Поскольку каждый продукт ПЦР-амплификации состоит из большого числа индивидуальных молекул, с точки зрения статистики этот метод является более репрезентативным. чем секвенирование отдельных клонов. Было показано, что точность определения степени метилирования таким методом сравнима с достигаемой при секвенировании 20 индивидуальных субклоновПЦР-фрагмента. Для секвенирования по Сэнгеру мы пользуемся услугами ЦКП «Геном». Пи этом мы используем внутренние ПЦР-праймеры для секвенирования обеих цепей амплифицированной ДНК. Для визуализации и экспорта результатов в файлф формата fasta мы используем бесплатную версию программы Chromas (https://technelysium.com.au/wp/chromas/). Для дедуцирования паттернов метилирования выравнивание конвертированныой и оригинальной последовательности мы осуществляем с помощью веб-сервиса Meth Tools 2.0.

5. Полученные результаты позволяют использовать определенные характеристики ответа растений на солевой стресс как тест-систему для ранней диагностики солеустойчивости. Найденные цитологические критерии позволяют тестировать функциональное состояние клеток у растений уже на стадии развития проростков.

Различия между сортами пшеницы в реакциях на солевой стресс, скорее всего, объясняются механизмами нейтрализации и элиминации АФК в стеблях и корнях. Устойчивость к солевому стрессу сопряжена не только с активной экспрессией митохондриальной супероксид-дисмутазы *MnSOD*, но и экспрессией других супероксид-дисмутаз.

6. Дипептиды глицил-глицин (GlyGly) и глицил-аспарагиновая кислота (GlyAsp), а также аминокислота глицин (Gly) являются биологически активными молекулами, регулирующими рост и развитие растений в концентрациях ~10–7 M. Оба пептида и глицин изменяли экспрессию генов семейств GRF и KNOX в каллусах и проростках табака. Вероятно, именно, изменения в экспресии этих регуляторных генов объясняют влияния исследованных пептидов и глицина на рост и развитие каллусов и проростков.

7. Отрицательно заряженный тетрапептид AEDL, по-видимому, непосредственно взаимодействует с положительно заряженными аминокислотными остатками гистонов, в первую очередь – N-концевым лизиновым остатком гистона H1 и 36-м лизиновым остатком гистона H3. Это приводит к деконденсации хроматина и увеличению активности генов, участвующих в развитии каллусов табака.

8. У женщин в поздней постменапаузе (>60 лет) скорость прогрессирования атеросклероза выше, чем в ранней постменапаузе, что приводит к статистически значимому увеличению толщины интимы сонной артерии за 2 года. У таких женщин фитоэстроген замедляет развитие атеросклероза.

9. Показано, что натуральный противовоспалительный препарат Inflaminat при длительном приеме оказывает положительное действие на течение хронической обструктивной пневмонии: уменьшает выраженность негативных симптомов (одышка, кашель. отделение мокроты) и увеличивает объем форсированного выдоха.

***Публикации:***

* 1. [Faletrov Y.V.](https://istina.msu.ru/workers/3566898/), [Efimova .V.S](https://istina.msu.ru/workers/264030373/), [Horetski .M.S](https://istina.msu.ru/workers/264030375/), [Tugaeva K V.](https://istina.msu.ru/workers/264030376/), [Frolova N.S.](https://istina.msu.ru/workers/264030377/), [Quingquing Lin](https://istina.msu.ru/workers/264030378/), [Isaeva L.V.](https://istina.msu.ru/workers/1422013/), [Rubtsov M A.](https://istina.msu.ru/workers/1612397/), [Sluchanko N.N.](https://istina.msu.ru/workers/457197/), [Novikova L A.](https://istina.msu.ru/workers/3558737/), [Shkumatov V M.](https://istina.msu.ru/workers/1422065/) New [20-hydroxycholesterol-like compounds with fluorescent NBD or alkyne labels: Synthesis, *in silico* interactions with proteins and uptake by yeast cells](https://istina.msu.ru/publications/article/264030383/). [*Chemistry and Physics of Lipids*](https://istina.msu.ru/journals/57301/) 2020, 227:104850. doi:[10.1016/j.chemphyslip.2019.104850](http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.104850%22%20%5Ct%20%22_blank).
	2. [Efimova Vera S.](https://istina.msu.ru/workers/7861138/), [Isaeva Ludmila V.](https://istina.msu.ru/workers/1422013/), [Orekhov Philipp S.](https://istina.msu.ru/workers/2539510/), [Bozdaganyan Marine E.](https://istina.msu.ru/workers/7580384/), [Rubtsov Mikhail A.](https://istina.msu.ru/workers/1612397/), [Novikova Ludmila A.](https://istina.msu.ru/workers/3558737/) [Using a viral 2A peptide-based strategy to reconstruct the bovine P450scc steroidogenic system in S. cerevisiae](https://istina.msu.ru/publications/article/331413817/). [*J Biotechnology*](https://istina.msu.ru/journals/71380/) 2020, S0168-1656(20)30299-6. doi:10.1016/j.jbiotec.2020.10.028.
	3. Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Vanyushin B.F. Quantitative analysis of DNA methylation by bisulfite sequencing. In: Guest P. (eds) Clinical and Preclinical Models for Maximizing Healthspan. *Methods in Molecular Biology* 2020, 2138:297-312, Humana, New York, NY. doi:10.1007/978-1-0716-0471-7\_21.
	4. Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Vanyushin B.F. The effects of parabiosis on aging and age-related diseases. In: Guest P. (eds) Reviews on New Drug Targets in Age-Related Disorders. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2020, 1260:107-122, Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-030-42667-5\_5.
	5. Ashapkin V., Khavinson V., Shilovsky G.*,* Linkova N., Vanyushin B*.* Gene expression in human mesenchymal stem cell aging cultures: modulation by short peptides. *Molecular Biology Reports*, 2020,47:4323–4329. doi:10.1007/s11033-020-05506-3.
	6. Ashapkin VV, Kutueva LI, Aleksandrushkina NI, Vanyushin BF. Epigenetic mechanisms of plant adaptation to biotic and abiotic stresses. *Int J Mol Sci*. 2020; 21:7457. doi: 10.3390/ijms21207457.
	7. Kononenko N, Baranova E, Dilovarova T, Akanov E, and Fedoreyeva L. Oxidative damage to various root and shoot tissues of durum and soft wheat seedlings during salinity. *Agriculture* 2020, 10:55. doi:10.3390/agriculture10030055.
	8. Fedoreyeva LI, Kononenko NV, Baranova EN, Dilovarova TA, Smirnova EA, and Vanyushin BF. Dipeptides and glycine modulate development of seedlings and regenerants of tobacco Nicotiana tabacum L. *Biology Bulletin* 2020, 47:364–373. doi:10.1134/S1062359020030036.
	9. Fedoreyeva LI, Vanyushin BF, Baranova EN. Peptide AEDL alters chromatin conformation via histone binding. *AIMS Biophysics* 2020, 7:1-16. doi:10.3934/biophy.2020001.
	10. Kirichenko TV, Myasoedova VA, Ravani AL, Sobenin IA, Orekhova VA, Romanenko EB, Poggio P, Wu WK, Orekhov AN. Carotid atherosclerosis progression in postmenopausal women receiving a mixed phytoestrogen regimen: Plausible parallels with Kronos early estrogen replacement study. *Biology* 2020, 9:48. doi:10.3390/biology9030048.
	11. Kirichenko TV, Sobenin IA, Markina YV, Gerasimova EV, Grechko AV, Kashirskikh DA, Romanenko EB, Wu WK, Orekhov AN. Clinical effectiveness of a combination of black elder berries, violet herb, and calendula flowers in chronic obstructive pulmonary disease: the results of a double-blinded placebo-controlled study. *Biology* 2020, 9:83. doi:10.3390/biology9040083.
	12. Mushenkova NV, Summerhill VI, Zhang D, Romanenko EB, Grechko AV, Orekhov AN. Current advances in the diagnostic imaging of atherosclerosis: Insights into the pathophysiology of vulnerable plaque. *Int J Mol Sci*. 2020, 21:2992. doi:10.3390/ijms21082992.
	13. Orekhov AN, Grechko AV, Romanenko EB, Zhang D, Chistiakov DA. Novel approaches to anti-atherosclerotic therapy: Cell-based models and herbal preparations. *Curr Drug Discov Technol*. 2020, 17:278-285. doi: 10.2174/1570163816666190101112241.

***Педагогическая работа в 2016 г.:***

1 дипломник, Замалутдинова Софья - студентка 2 курса магистратуры кафедры молекулярной биологии Биологического факультета МГУ.