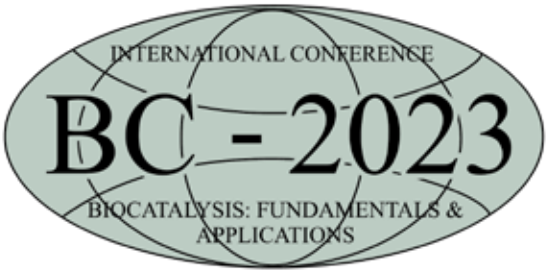
INTERNATIONAL CONFERENCE

BC - 2023

BIOCATALYSIS: FUNDAMENTALS & APPLICATIONS

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

13-ой Международной научной конференции
«БИОКАТАЛИЗ. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ»
(БИОКАТАЛИЗ - 2023),
г. Суздаль, Россия | Июнь, 25-29 2023



ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ
13-ой Международной научной конференции «БИОКАТАЛИЗ. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ» (БИОКАТАЛИЗ - 2023), г. Суздаль, Россия | Июнь, 25-29 2023

В рамках конференции прошли школы молодых учёных:

«Разработка генетических технологий создания штаммов-продуцентов для промышленной биотехнологии»
и
«Генетические технологии для профилактики и лечения инфекционных, онкологических и аутоиммунных заболеваний»

13-ая Международная научная конференция «БИОКАТАЛИЗ. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ» (БИОКАТАЛИЗ - 2023), Суздаль, 2023. – 261 с.

ISBN 978-5-6048945-8-3

Настоящие материалы Конференции созданы на основании информации, предоставленной участниками и одобренные организационным комитетом. Материалы тезисов публикуются в авторской версии. Организаторы не несут ответственности за неточности и упущения в названиях и адресах, представленных в данном сборнике.
Основная тематика конференции:

- Структура, каталитический механизм, генетическая инженерия ферментов, методы и достижения в конструировании белков. Модели ферментов (биозимы).
- Получение и применение биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов, мультиферментных систем и клеток микроорганизмов в пищевой промышленности, органическом синтезе, агробиотехнологии и экологии.
- Ферменты и эффекторы в медицине, иммунохимии, нейрохимии и геномике. Биокаталитические технологии в развитии физико-химических методов для биомедицинских исследований. Биосенсоры и биочипы. Цифровые технологии в биокатализе. Ферменты резистентности. Ферменты и новая энергетика. Космическая энзимология.

ISBN 978-5-6048945-8-3

9 785604 894583

Издательство: ООО «АДМИРАЛ ПРИНТ»,
Москва, ул. Барклая, д. 13 стр. 1

Конференция Биокатализ-2023
посвящена столетию со дня рождения
ИЛЬИ ВАСИЛЬЕВИЧА БЕРЕЗИНА,
который был инициатором и организатором конференций
по инженерной энзимологии и Биокатализу,
начиная с 1974 года

ЖИЗНЬ И ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ИЛЬИ ВАСИЛЬЕВИЧА БЕРЕЗИНА



В 2023 г. исполняется 100 лет со дня рождения выдающегося учёного и организатора науки, члена-корреспондента Академии наук СССР, лауреата Ленинской премии СССР, одного из лучших деканов химического факультета МГУ, директора Института биохимии имени А.Н. Баха, нашего незабвенного учителя и друга Ильи Васильевича Березина.

Илья Васильевич Березин родился 9 августа 1923 г. в Астрахани, в семье медиков. Через два года скончался его отец, Василий Ильич, профессор фармакологии и первый ректор Астраханского государственного медицинского института. Мать И.В. Березина, Нина Ивановна Ермакова, врач-гистолог, доктор медицинских наук, в 1937 г. переехала с семьей в Москву, где в 1940 г. И.В. Березин окончил среднюю школу и поступил в Московский авиационный институт им. С. Орджоникидзе. Но учиться Илье помешала Война.

2 июля 1941 г. студент второго курса МАИ Илья Березин записался добровольцем на фронт. Начав рядовым, И.В. Березин прошел всю войну и встретил Победу в звании старшего лейтенанта, командира минометной батареи 1-го Белорусского фронта. За боевые действия Илья Васильевич был награжден орденом Отечественной войны I степени, орденом Красной Звезды и многими медалями.

Илья Васильевич демобилизовался в январе 1946 года и сразу решил продолжить учебу в МАИ, но это по разным причинам не удалось. Тогда по совету однополчанина Илья Березин направился на химический факультет МГУ. Его принял зам. декана Н.В.Костин, просмотрел все документы и без каких-либо испытаний зачислил его на 1-й курс химфака. Этот выбор оказался счастливым. С тех пор вся жизнь И.В. Березина была тесно связана с МГУ и химическим факультетом.

По окончании университета в 1950 г. И.В. Березин был рекомендован в аспирантуру при кафедре химической кинетики. которую возглавлял академик Н.Н. Семенов. Под руководством Н. М. Эмануэля Илья Васильевич подготовил и в 1953 г. успешно защитил кандидатскую диссертацию на тему «Кинетика и химизм жидкофазного окисления циклогексана и н-гептана кислородом воздуха под давлением». Эта работа принесла ему широкую известность среди специалистов и послужила основой для монографии «Окисление циклогексана», изданной в 1962 г. в соавторстве с Е.Т. Денисовым и Н.М. Эмануэлем.

В 1962 году в возрасте 39 лет Илья Васильевич Березин защитил докторскую

диссертацию на тему: «Исследования в области элементарных реакций свободных радикалов в жидкой фазе». Эта диссертация стала итогом почти десятилетних исследований по изучению взаимосвязи структуры органических соединений и их реакционной способности в свободно-радикальных реакциях. Причем тематика докторской диссертации была совершенно новой и отличалась по тематике от его кандидатской диссертации. В 1965 г. И.В. Березин был избран профессором.

Сразу после защиты докторской диссертации Илья Васильевич был командирован на стажировку в Гарвардский университет США. В результате знакомства с работами учёных многих американских университетов Илья Васильевич пришел к убеждению, что новой, наиболее интересной, актуальной и перспективной областью применения методов химической кинетики является изучение физико-химических основ действия ферментов. После возвращения из США И.В.Березин, начав экспериментальные работы в области исследования кинетики и механизма действия ферментов, предложил химическому факультету ввести новую образовательную специальность: "Физическая химия ферментативных процессов". Был создан и прочитан им курс лекций, в который Илья Васильевич внес строгие экспериментальные и теоретические методы и подходы исследования ферментативных реакций.

Это время совпало с организацией в МГУ академиком А.Н. Белозерским Межфакультетской лаборатории молекулярной биологии и биоорганической химии (ныне это Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского). И.В.Березину была предложена должность заместителя директора Межфакультетской лаборатории (Корпуса А) и заведующего Отделом биокинетики, которые он занимал до 1970 года. Илья Васильевич внес огромный вклад в организацию и единение этого довольно пестрого научного конгломерата, в который входили как отдельные кафедры химфака и биофака, так и самостоятельные научные отделы, подчинявшиеся дирекции Межфакультетской лаборатории. Такие организованные по инициативе Ильи Васильевича структуры как Научно-технический совет (НТС), отдел научной информации, методические лаборатории, ремонтные, механические и стеклодувные мастерские общего пользования исправно и эффективно функционируют до сих пор.

С 1963 года научные интересы И.В. Березина были сфокусированы на выяснении природы эффективности и специфичности действия ферментов как химических катализаторов. К концу 1960-х годов были экспериментально обоснованы те основные положения, которые вошли в понятие «Химическая энзимология»:

- двухцентровая модель ферментативного катализа, обосновывающая физико-химические причины снижения активационного барьера реакций, катализируемых ферментами;
- мицеллярная модель ферментативного катализа, позволившая объяснить многие особенности функционирования ферментов эффектами сближения и концентрирования реагентов в микрогетерогенных коллоидных системах, что послужило основой для развития мицеллярной энзимологии и ферментативного катализа в органических растворителях;
- новые подходы к использованию ферментов для управления сложными химическими процессами, такими как усиления слабых световых сигналов.

Работы И.В. Березина по окислению углеводородов, по жидкофазным

реакциям свободных радикалов и изучению физико-химических основ ферментативного катализа послужили основанием для его избрания членом-корреспондентом АН СССР в 1970 году по Отделению химии.

И.В. Березин был не только талантливым учёным, но и талантливым организатором науки и педагогом. В 1969 г. И.В. Березин был избран деканом химического факультета МГУ и занимал этот пост в течение 12 лет, до 1981 г. Тесные деловые контакты декана с Госкомитетом по науке и технике (ГКНТ) СССР давали возможность регулярно получать значительное целевое финансирование на новые научные разработки факультета. Благодаря усилиям И.В. Березина, на факультете были организованы 5 проблемных лабораторий и ряд научных групп на различных кафедрах факультета. Это дало возможность большому числу талантливых выпускников факультета занять достойное место в коллективе химического факультета МГУ. Численность научных штатов на химфаке возросла в несколько раз. Большая работа была проведена по укреплению научных контактов между различными кафедрами факультета для проведения совместных исследований. Ветераны помнят, например, памятное расширенное заседание учёного совета химфака в Большой химической аудитории вначале 70-х годов, когда Илья Васильевич сделал большой и увлекательный доклад, в котором провозгласил эру иммобилизованных ферментов – биокатализаторов, способных совершить переворот в химической промышленности.

В 1972 году И.В. Березин был назначен председателем Научного совета ГКНТ СССР «Ферменты и их применение в народном хозяйстве и медицине». Впоследствии эти работы получили название инженерной энзимологии, а И.В. Березин заслуженно считается основателем одной из ведущих мировых научных школ инженерной энзимологии. И.В. Березиным и его учениками были заложены основы многих направлений, которые затем вошли в золотой фонд отечественной и мировой науки. Среди них наиболее известны следующие:

- иммобилизация и стабилизация ферментов для создания практически важных биокатализаторов;
- биоэлектрокатализ — прямое сопряжение окислительно-восстановительных ферментативных и электрохимических процессов; явление биоэлектрокатализа было зарегистрировано как открытие в 1978 г.;
- применение иммобилизованных ферментов в медицине: создание и успешное испытание ферментативных лекарственных препаратов;
- ферментативный гидролиз целлюлозы;
- ферменты в тонком органическом синтезе и для фармацевтической промышленности (получение антибиотиков, синтез хиральных соединений).
- аналитическая биотехнология и ферменты для медицинской диагностики;
- биоконверсия солнечной энергии: получение фотоводорода, биогаза; биолюминесцентная люциферин-люциферазная система светляков и ее применение в биотехнологии, экологии и медицине.

Ряд прикладных разработок в области инженерной энзимологии, выполнявшихся под руководством И.В. Березина, были успешно внедрены в практику. Среди них следует, в первую очередь, назвать создание тромболитического препарата «стрептодеказа». За цикл исследований теоретического, экспериментального клинического обоснования применения иммобилизованных ферментов для лечения сердечно-сосудистых заболеваний И.В. Березин

в составе авторского коллектива был удостоен Ленинской премии (1982 г.). На заводах Главмикробиопрома были успешно испытаны и запущены в производство ферментативная технология получения β-лактамных антибиотиков, процесс ферментативного гидролиза целлюлозосодержащих отходов и получения ферментов - целлюлаз. Широкое распространение получили диагностические наборы на основе иммуноферментного анализа. Реагенты на основе иммобилизованной люциферазы светляков были успешно испытаны для быстрого определения биозараженности различных технических материалов, инфицированных ран и для быстрого подбора антибиотиков при лечении пациентов.

Научная новизна и практическая значимость проблем, развиваемых коллективом во главе с И.В. Березиным, дали ему возможность создать в 1974 году на химическом факультете МГУ кафедру химической энзимологии на базе группы ферментативного катализа кафедры химической кинетики и отдела биокинетики Межфакультетской лаборатории им. А.Н. Белозерского. В 1974 г. кафедра выпустила первых студентов. И.В. Березин создал школу физико-химиков, плодотворно решающих задачи фундаментальной и прикладной энзимологии. Педагогический дар И.В. Березина был уникальным. Он был открыт для общения, как с сотрудниками, так и со студентами, всячески поддерживал их и в науке, и в жизни. Всегда радовался успехам своих учеников, доверял им и стремился как можно быстрее сделать их самостоятельными исследователями. Среди учеников И.В. Березина более 150 докторов и кандидатов наук, несколько членов РАН и Академий других стран, Ряд из них возглавляют Научные институты РАН, Научные центры и кафедры в университетах, имея заслуженное признание не только в России, но и за рубежом.

И.В. Березин был горячим и убеждённым сторонником неразрывности университетской и академической науки. Многогранная деятельность И.В. Березина снискала ему заслуженное уважение в академических кругах. В 1981 г. И.В. Березину было предложено возглавить Институт биохимии им. А.Н. Баха АН СССР, старейший биохимический институт страны с богатыми научными традициями. Находясь на этом посту до 1987 г., И.В. Березин сумел не только сохранить традиции Института, но и развить их, сочетая идеологию химической энзимологии и биологической химии. И.В. Березин организовал в составе ИНБИ новую проблемную лабораторию инженерной энзимологии. Впоследствии его ученики возглавили новые лаборатории: иммунобиохимии, физической биохимии, химической энзимологии, биотехнологии ферментов и молекулярной инженерии. За короткое время И.В. Березин вместе с учениками вывел эти исследования на новый уровень.

И.В. Березин был демократичным, отзывчивым, великодушным и исключительно порядочным человеком, он не терпел доносов и кляуз, поддерживал и защищал своих учеников. Его дом был всегда открыт для друзей и учеников. Все это привлекало и притягивало к И.В. Березину людей и снискало ему почет и уважение. И.В. Березин создавал вокруг себя удивительную ауру, которая сохранилась в его учениках и всех тех, кто имел счастье общения с ним.

Илья Васильевич Березин прошёл короткий по времени, но огромный по активности и результатам жизненный путь. Его жизнь была интересной и творчески полной. Отмечая 100-летие со дня рождения Ильи Васильевича, мы с благодарностью вспоминаем всё то многое, что он сделал для науки, в науке и для людей.

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ

Варфоломеев С.Д., чл.-корр. РАН – председатель
Гачок И.В. к.х.н. – учёный секретарь

Члены Программного комитета

Бачурин С.О. – академик РАН
Габибов А.Г. – академик РАН
Дзантиев Б.Б. – профессор, д.х.н.
Егоров А.М. – академик РАН
Клячко Н.Л. – профессор, д.х.н.
Курочкин И.Н. – профессор, д.х.н.
Лаврик О.И. – академик РАН
Попов В.О. – академик РАН
Савицкий А.П. – профессор, д.х.н.
Синицын А.П. – профессор, д.х.н.
Тишков В.И. – профессор, д.х.н.
Угарова Н.Н. – профессор, д.х.н.
Швядас В.Ю. – профессор, д.х.н.

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ

Варфоломеев С.Д., чл.-корр. РАН – председатель
Гачок И.В. к.х.н. – учёный секретарь

Члены Организационного комитета

Бачурин С.О. – академик РАН
Габибов А.Г. – академик РАН
Дзантиев Б.Б. – профессор, д.х.н.
Егоров А.М. – академик РАН
Зайцева Е.А. – к.х.н.
Клячко Н.Л. – профессор, д.х.н.
Курочкин И.Н. – профессор, д.х.н.
Лаврик О.И. – академик РАН
Попов В.О. – академик РАН
Савицкий А.П. – профессор, д.х.н.
Синицын А.П. – профессор, д.х.н.
Страховская М.Г. – д.б.н.
Тишков В.И. – профессор, д.х.н.
Угарова Н.Н. – профессор, д.х.н.
Федорчук В.В. – к.х.н.
Швядас В.Ю. – профессор, д.х.н.

ОРГАНИЗАТОРЫ

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Российская академия наук

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

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН)

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

Синицын Аркадий Пантелеймонович –
профессор кафедры химической энзимологии
Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Ким Борис Борисович –
выпускник кафедры химической энзимологии
Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Профессиональный организатор конгрессов
WWW.MESOL.RU

СОДЕРЖАНИЕ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ	12
УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ	35
ПОСТЕРНЫЕ ДОКЛАДЫ	166
ЗАОЧНЫЕ ДОКЛАДЫ	233

Цветовые обозначения:

Школа молодых учёных «Генетические технологии для профилактики и лечения инфекционных, онкологических и аутоиммунных заболеваний»

Школа молодых учёных «Разработка генетических технологий создания штаммов-продуцентов для промышленной биотехнологии»



ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

«КАТАЛИЗ – ЭТО ХИМИЯ БУДУЩЕГО» (В.Н. ИПАТЬЕВ)

Белецкая И.П.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет.
119991, Москва, Ленинские Горы, д. 1, стр. 3;
e-mail: beletska@org.chem.msu.ru

В докладе рассмотрены различные виды катализа (металлокомплексный с использованием соединений палладия и меди, органокатализ, нанокатализ, фоторедокскатализ), изменивших методы синтеза в органической химии.

ФЕРМЕНТЫ КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ КАК МИШЕНИ АНТИВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

Готтих М.Б., Анисенко А.Н.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, д. 1, строение 40, Москва, Россия
gottikh@belozersky.msu.ru

Для обнаружения участков повреждений ДНК, которые могут нарушить целостность генома, и для координации процесса репарации этих повреждений эукариоты развили сложную сигнальную сеть, которая в первую очередь регулируется киназами семейства PI3K: ATM, ATR и DNA-PK и поли(АДФ-рибозо)полимеразами. Многие вирусы вызывают повреждение ДНК и генетическую нестабильность в инфицированных клетках в течение своего жизненного цикла и могут влиять на работу систем репарации. Интересно, что некоторые вирусы используют системы репарации для собственной выгоды. Выяснение взаимодействий между вирусами и участниками систем репарации важно как для понимания патогенеза вирусных инфекций, так и для разработки новых подходов к борьбе с ними. Так, ВИЧ-1 может использовать в своих интересах белки из системы репарации двуцепочечных разрывов в ДНК по пути негомологичного соединения концов. Интеграция вирусной ДНК в геном клетки, осуществляемая вирусным ферментом интегразой, приводит к образованию одноцепочечных брешей в клеточной ДНК, которые необходимо репарировать. Мы проанализировали участие киназ семейства PI3K, ATM, ATR и DNA-PK, в пост-интеграционной репарации ДНК (ПИР) и обнаружили, что ингибирование DNA-PK и ATM, но не ATR, значительно снижает эффективность ПИР. Это довольно неожиданный результат, учитывая, что обе киназы являются сенсорами двухцепочечных разрывов, которые не возникают при интеграции. Мы показали, что DNA-PK рекрутируется в сайты интеграции в результате связывания своей субъединицы Ku70 с вирусной интегразой, и нарушение этого связывания нарушает репликацию ВИЧ-1. Изучение структуры сайта связывания этих белков позволило провести молекулярный докинг и найти ингибиторы взаимодействия интегразы и Ku70. Соединение-лидер способно подавлять пост-интеграционную репарацию и репликацию вируса в микромолярных концентрациях. Несомненно, требуется дальнейшая оптимизация структуры ингибитора, но тем не менее можно говорить о новом подходе к подавлению репликации ВИЧ-1 путем блокирования ПИР.

Работа выполнена при поддержке грантов РНФ 19-74-10021, 17-14-01107.

ЭКСПРЕССНЫЕ ИММУНОСЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ: НОВЫЕ РЕШЕНИЯ И ВОЗМОЖНОСТИ

Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН,
Ленинский проспект 33, 119071 Москва;
dzantiev@inbi.ras.ru

Развитие иммуносенсорных средств медицинской диагностики, экологического мониторинга, контроля потребительской продукции требует роста чувствительности, экспрессности и производительности. В докладе представлены исследования лаборатории иммунобиохимии ФИЦ Биотехнологии РАН, направленные на достижение этих целей.

Разработаны теоретические описания взаимодействий в разных типах иммуноаналитических систем. Предложенные математические модели охарактеризованы с помощью алгебраических решений и численного итерационного анализа. Рассмотрены особенности односайтных (конкурентных), двухсайтных (сэндвич) и серодиагностических иммунохроматографических сенсорных систем. Установлены зависимости регистрируемых сигналов от констант реакций и концентраций реагентов. На основании этих зависимостей определены факторы, лимитирующие снижение пределов обнаружения. Предложены форматы иммуносенсорного тестирования, отличающиеся составом и порядком формирования детектируемых комплексов и обеспечивающие улучшение аналитических характеристик.

Рассмотрено применение антител и аптамеров в качестве рецепторных молекул, изменения их аффинности при различных видах модификации и иммобилизации. Разработаны алгоритмы оценки состава комплексов антител с нанодисперными носителями. Разные режимы иммобилизации на поверхности наночастиц сопоставлены по степени сохранения рецепторными молекулами реакционной способности. Охарактеризовано влияние этого фактора на параметры аналитических систем с использованием конъюгатов биорецептор–наночастица.

Описаны изменения характеристик иммуносенсоров при варьировании состава, размеров и формы используемых в них наночастиц – носителей и маркеров. Изучены возможности биоаналитического применения магнитных иммуносорбентов. Сопоставлены иммуносенсоры с колориметрической и флуориметрической детекцией наночастиц-маркеров.

Рассмотрены взаимодействия в мультиплексных иммунохроматографических системах, способы модуляции их параметров. Предложена процедура выбора взаимного расположения зон связывания в проточных иммуноаналитических системах, обеспечивающая сохранение в мультианализе пределов обнаружения монопараметрических систем, критерии оценки взаимодействующих реагентов для реализации этой процедуры.

Предложен ряд подходов к усилению сигнала в иммунохроматографических системах, включающих использование каталитических свойств ферментов и нанозимов, агрегацию функционализированных наночастиц, управление последовательностью формирования детектируемых комплексов.

Показана эффективность разработанных подходов при создании систем иммунодетекции различных практически значимых аналитов – антибиотиков, пестицидов, микотоксинов, гормонов, кардиомаркеров и воспалительных маркеров, антител к патогенам, вирусных и бактериальных возбудителей заболеваний человека, животных и растений.

Работа выполняется при поддержке Российского научного фонда, грант 19-14-00370.

РОЛЬ МУТАЦИЙ БЕТА-ЛАКТАМАЗ В РАЗВИТИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ

Егоров А.М.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.3; e-mail: alex.m.egorov@enz.chem.msu.ru

Проблема резистентности патогенных бактерий к антибиотикам приобрела характер глобальной мультифакторной угрозы, что вызывает необходимость ее разностороннего изучения. В реализации разнообразных механизмов резистентности участвуют суперсемейства бактериальных ферментов, совокупность которых получила название «энзистом». Важнейшим составляющей «энзистома» являются бета-лактамазы (БЛ), обусловливающие устойчивость бактерий к бета-лактамным антибиотикам. За последние 80 лет общая численность БЛ достигла более 7 тысяч белков, различающихся по структуре, каталитической активности, специфичности и стабильности гидролаз и содержащих серин или цинк в активном центре.

В эволюции БЛ основную роль играют мутации аминокислот, которые делятся на ключевые и сопутствующие, влияющие на их активность, специфичность и стабильность. Особое внимание уделяется мутациям пептидных петель. Мутации Ω-петли, входящей в структуру активного центра, влияют на изменение его конформации. Изучение мутаций позволит перейти к созданию новых препаратов против резистентности.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова 123032300028-0.

ИССКУСТВЕННАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Зверева М.Э.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, химический факультет, 119991Москва, Ленинские горы д.1, стр.3
e–mail: zvereva@chem.msu.ru

Аптамеры — это короткие одноцепочечные молекулы нуклеиновых кислот (ДНК, РНК или их синтетических модифицированных аналогов), которые с высоким сродством и специфичностью взаимодействуют с любыми желаемыми мишенями. Для выбранной мишени аптамеры отбирают методами искусственной эволюции лигандов (SELEX). Аптамеры используют в фундаментальных исследованиях как специфические лиганды ферментов, в качестве терапевтических средств, в качестве синтетических аналогов антител для создания биосенсорных и/или визуализирующих систем.

В докладе представлена информация о последних достижениях в этой активно развивающейся области исследований. Сделан акцент на новые методы получения аптамеров [1] и их применение в биосенсорике как узнающих мишень лигандов [2] и в качестве «якорной» основы для закрепления узнающих мишень элементов [3].

В докладе представлен авторский метод отбора аптамеров на основе пред-структурированных библиотек для SELEX и ускоренного анализа результата селекции методом нанопорового секвенирования в комбинации с биоинформатическим анализом. Возможность успешной реализации предложенного подхода показана на примере отбора ДНК-аптамера к поверхностному белку коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV2), в диагностике которого широко используются антитела, специфичные к антигенам вируса. Использование модифицированного SELEX привело к отбору ряда аптамеров, взаимодействующих с рецептор-связывающим доменом спайкового белка SARS-CoV2 (RBD) штамма Wuhan-Hu-1. Лучший кандидат по отбору был химически синтезирован и протестирован на связывание со спайковым RBD-доменом SARS CoV2 S-белка из разных штаммов [1]. Kd комплекса сопоставим с известными аптамерами и зависит от посттрансляционной модификации белка [4]. С использованием аптамера была создана сенсорная система детекции с использованием метода поверхностно усиленной спектроскопии комбинационного рассеяния [2]. Предложенный метод отбора ДНК-аптамеров на основе пред-структурированных библиотек для SELEX и ускоренного анализа результата селекции методом нанопорового секвенирования был успешно апробирован для селекции аптамера, специфичного к клеточным мишеням на примере экспрессирующих на поверхности белок CD133 клеток [5].

Литература

1. Khrenova, M.G., Nikiforova, L.A., Grabovenko F.I., Zavyalova E.G., **Zvereva M.I**. In Vitro Selection of an Aptamer Targeting SARSCoV-2 Spike Protein with Nanopore Sequence Identification Reveals Discrimination Between the Authentic Strain and Omicron. – ChemRxiv, 2022, 1–23.
2. Samodelova M.V., Kapitanova O.O., Meshcheryakova N.F., Novikov S.M., Yarenkov N.R., Streletskii O.A., Yakubovsky D.I., Grabovenko F.I., Zhdanov G.A., Arsenin A.V., Volkov V.S., Zavyalova E.G., Veselova I.A., and **Zvereva M.I**. Model of the sars-cov-2 virus for development of a dna-modified, surface-enhanced raman spectroscopy sensor with a novel hybrid plasmonic platform in sandwich mode. - Biosensors, 2022. - 12(9), 768.
3. Eremina O.E., Zatsepin T.S., Farzan V.M., Veselova I.A., **Zvereva M.I.**. DNA detection by dye labeled oligonucleotides using surface enhanced raman spectroscopy. - Mendeleev Communications, 2020, 30(1), 18–21.
4. Grabovenko F.I., Nikiforova L.A., Yanenko B.I, Ulitin A.B., Loktyushov E.V, Zatsepin T.S., Zavyalova E.G, **Zvereva M.I.**. Glycosylation of receptor binding domain of sars-cov-2 s-protein influences on binding to immobilized dna aptamers. - International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(1), 557.
5. Grabovenko F.I, Kisil O.V., Pavlova G.V., **Zvereva M.I.** Protein cd133 as a tumor stem cell marker. - Voprosy neirokhirurgii imeni N.N. Burdenko, 2022, 86 (6), 113.

Работа выполнена при финансовой поддержке завершившихся проектов РФФИ: проект 20-04-60477 и 18-29-08040, продолжается в рамках договора с ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н.Бурденко» Минздрава России № 32110765079(271/21).

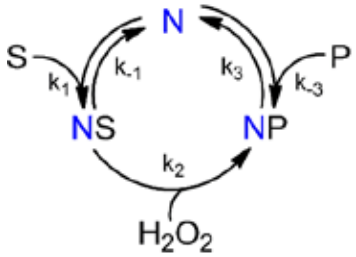
НАНОЗИМЫ: КАТАЛИТИЧЕСКИЕ НАНОЧАСТИЦЫ, ИМИТИРУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ

Карякин А.А.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3
e-mail: aak@analyt.chem.msu.ru

Нанозимами называют наночастицы, имитирующие ферментативную активность. Из очевидных преимуществ нанозимов их стабильность, дешевизна, а также высокая активность за счет возможности включения в катализ целого ансамбля активных центров, занимающих поверхность, а порой и объем наночастицы.

Ранее нами был открыт наиболее эффективный электрокатализатор восстановления пероксида водорода на основе гексацианоферрата железа (берлинской лазури) [1, 2]. Для создания имитирующих пероксидазу нанозимов был осуществлен каталитический синтез наночастиц берлинской лазури, включающий стадию активации пероксида водорода [3]. Активность полученных наночастиц увеличивается пропорционально их объему; большие нанозимы превосходят по каталитической константе фермент пероксидазу до 10 000 раз. По сравнению со всеми известными наночастицами с пероксидазной активностью нанозимы на основе каталитически синтезированной берлинской лазури проявляют поистине ферментативные свойства: высокую селективность (отсутствие оксидазной и каталазной активностей), а также способность работать при физиологических значениях pH [3].



Исследование механизма действия нанозимам проведено с использованием ферментативной кинетики [4]. В отличие от пероксидазы, чей активный центр вначале реагирует с пероксидом водорода, в случае нанозимов H_2O_2 окисляет их комплекс с восстанавливающим субстратом. Методом интегральной кинетики зарегистрирована медленная стадия выброса продукта. Взаимодействие нанозимов с восстанавливающими субстратами происходит в 100 раз быстрее по сравнению с ферментом. Каталитическая константа для нанозимов оказалась также на для порядка более высокой, чем для пероксидаз. Таким образом установлено еще одно преимущество нанозимов по сравнению с имитируемыми ими ферментами: возможность достижения в 100 раз более высоких бимолекулярных констант скорости [4]. Возможно, это преимущество связано с равнодоступностью поверхности нанозимов для субстратов, исключающее влияние вращения на диффузионно-лимитируемые константы.

Литература
1. A.A. Karyakin (обзор). *Current Opinion in Electrochemistry* **5** (2017) 92-98.
2. M.A. Komkova, A.A. Karyakin (обзор). *Microchim. Acta* **189** (2022) 290.
3. M.A. Komkova, E.E. Karyakina, A.A. Karyakin. *J. Am. Chem. Soc.* **140** (2018) 11302-7.
4. M.A. Komkova, O.A. Ibragimova, E.E. Karyakina, A.A. Karyakin. *J. Phys. Chem. Lett.* **12** (2021) 171-6.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-13-00131, https://rscf.ru/project/19-13-00131

БИОТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕРАБОТКИ УНИКАЛЬНОГО СЕВЕРНОГО БИОСЫРЬЯ С ПОЛУЧЕНИЕМ ПРОДУКТОВ МЕДИЦИНСКОГО И ПИЩЕВОГО НАЗНАЧЕНИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Кершенгольц Б.М., Шашурин М.М.

Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской Академии Наук.
677980, г.Якутск, просп. Ленина, 41.
kerschen@mail.ru

Ткани северных экоформ растений и аборигенных видов животных отличаются в 1,5 ÷1,8 раза повышенным содержанием и в 2,0÷2,5 раза большим изоструктурным разнообразием биоактивных веществ (БАВ) регуляторного и защитного действия. Это позволяет им выживать в экстремальных условиях среды, т.к. именно изоструктурное разнообразие этих групп БАВ является количественной мерой адаптивного потенциала организма (как биоразнообразие – количественной мерой адаптивного потенциала популяций и экосистем). Разработанные биотехнологии (механохимической активации; обработки биосырья CO_2 в состоянии сверхкритической жидкости; ультра- и нанофильтрации; криофракционирования и др.) позволяют наиболее полно и без потерь извлекать весь сбалансированный комплекс БАВ. Причем, интактно выделяемые из биотканей многокомпонентные комплексы БАВ не могут быть получены химиосинтетическим или генноинженерным путем. Для ряда создаваемых биопрепаратов аналоги отсутствуют. Так как большинство этих природных БАВ - вещества неспецифического действия, то, будучи введенными в организм человека они оказывают сбалансированный физиологичный профилактический и лечебный эффект в качестве биопрепарата соответствующего направления действия.

Созданы, запатентованы, сертифицированы, организовано полупромышленное производство следующих биопрепаратов. (1) БАД Эпсорин (сырьё – панты северного оленя), обладает адаптогенным, иммуномодулирующим, актопротекторным, радиопротекторным действием, повышает физическую и умственную работоспособность, не является допингом, является основным активным веществом в составе промышленно выпускаемого безалкогольного, безкофеинового тонизирующего напитка «YES». (2) БАД «Ягель» (сырье – слоевища лишайников), направления действия: биодетоксикант внутренних сред организма (кровь, лимфа, интрастиций) в отношении широкого спектра эндо- и экзотоксинов, нормализует уровень сахара в крови у больных сахарным диабетом II типа, вызывает снижение в 1,3÷1,5 раза коэффициента атерогенности у страдающих атеросклерозом, обладает антитромбиновой и противоаутоиммунной активностью; (3) БАД Бетукладин (сырьё – слоевища лишайника и бетулин из коры березы), обладает широкой противовирусной, антибактериальной, - антикоагуляционной, гепатопротекторной, антгипоксантной и гиполипидемической, детоксикационной активностью, как и БАД «Ягель» входит в состав промышленно выпускаемой хлебобулочной продукции. Созданы также биопрепараты из: (1) жировой ткани нерпы Арктической, содержит повышенные концентрации ω-3- и ω-6-полинепредельных жирных кислот, обладает выраженным профилактическим и лечебным противоатеросклеротическим действием; (2) диспергированных коллагеновых волокон соединительной ткани северного оленя и якутской лошади (повышенное содержание глицина, пролина, аланина), обладает выраженным эффектом в отношении профилактики и лечения остеопений и остеопороза; (3) мышечно-жировой ткани якутской лошади, обладает высоким радиопротекторным действием; (4) тестикул северного оленя и якутской лошади, обладает высоким андрогено- и тестостероностимулирующим, геронтологическим действием, оптимизирует основной обмен веществ; хвои сосны – обладает криопротекторным действием.

Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки России по проекту «… и разработка биопрепаратов на основе природного северного сырья повышающих эффективность адаптационного процесса и уровень здоровья человека в экстремальных условиях среды» (код научной темы: FWRS-2021-0025; № гос.регистрации в ЕГИСУ: АААА-А21-121012190035-9), а также с использованием оборудования ЦКП ФИЦ «ЯНЦ СО РАН»

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИСТОРИЯ (ДНК-ГЕНЕАЛОГИЯ): ОТ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ К ОПИСАНИЮ ИСТОРИИ ДРЕВНЕГО МИРА

Клёсов А.А.

Академия ДНК-генеалогии, Москва 127591, ул. Дубнинская, д. 26, корп. 1, aklyosov@comcast.net

Показан переход от основных уравнений химической кинетики к уравнениям, описывающим динамику обратимых (стир-мутаций) и необратимых (снип-мутаций) ошибок, возникающих в Y-хромосоме человека при копировании ДНК от отца к сыну на протяжении всей истории человечества и ранее, на миллионы лет вглубь. Определены понятия гаплогрупп, субкладов и гаплотипов как мета-меток в Y-хромосоме, то есть мужской половой хромосоме. Показано, как идентификация этих меток в ДНК современных и древних людей позволяет изучать историю миграций древнего мира. Простая аналогия – колечко на лапке птицы позволяет орнитологам прослеживать миграции птиц. Роль колечка в ДНК-генеалогии играют мутации в ДНК. На простых примерах показан математический аппарат основ химической кинетики для расчетов датировок жизни древних предков по ДНК их современных потомков. Количественно описано в целом понятное утверждение, что чем дальше во времени жил общий предок рода или племени (или их представителей), тем больше мутаций накопилось в ДНК его потомков.

На конкретных примерах ДНК древних людей и наших современников показано:

1. Когда жили общие предки современных русских, украинцев, белорусов.
2. Когда жил общий предок современных евреев и арабов.
3. Кто такие исторические арии, когда они жили, в каких археологических культурах, их миграционный путь от Русской равнины на южный Урал и далее в Индостан, Иранское плато, Митаннийское царство в Сирии, на Алтай и в Китай.
4. Что общего в Y-хромосомах современных русских и современных индийцев (индусов высших каст и брахманов).
5. Заселение Европы около 5000 лет назад и какое отношение имеет к этому «курганная теория».
6. Были ли на Русской равнине в древности «финские охотники и рыболовы».
7. Были ли рюриковичи шведами и прочими скандинавами по происхождению. Мифы «норманской теории».
8. Почему большинство современных русских живут на Восточно-европейской равнине.
9. Кто такие баски, и действительно ли они очень древние.
10. Кто такие скифы и сарматы, и предки ли они современных русских.
11. Кто были этруски, и «русские» ли они? Или хотя бы славяне?
12. Кто были хазары? Евреи или в основном степняки?
13. Вышли ли наши предки из Африки? Какие к тому данные, и есть ли они?

ЛЕКАРСТВА НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ЭФФЕКТОРОВ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДОСТАВКИ В ОРГАНИЗМ

Клячко Н.Л.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
кафедра химической энзимологии, 119991, Москва, Ленинские горы, 1-11Б
e-mail: nlklyachko@gmail.com

Многие ферменты и белки, в целом, являются высокоспецифичными и эффективными терапевтическими агентами. Тем не менее, и в настоящее время существуют проблемы в их использовании в борьбе с патологическими состояниями и заболеваниями, связанные с доставкой этих биомолекул, для решения которых разрабатываются различные подходы.

В докладе представлен ряд примеров, охватывающих проблемы, связанные с активными формами кислорода и окислительным стрессом, антибиотикоустойчивостью и др., в решении которых могут быть использованы ферменты и их эффекторы. Обсуждаются результаты исследований по конструированию фермент-содержащих наноконтейнерных систем для медицинских применений (в том числе для доставки таких систем в центральную нервную систему, мозг, глаз).

Ряд существующих в настоящее время проблем связан с лечением заболеваний, вызываемых патогенными микроорганизмами. В разрабатываемой новой стратегии борьбы с бактериальными инфекциями на основе лекарственных форм ферментов бактериофагов, эффективных в разрушении патогенных микроорганизмов, созданы наноформуляции, в которых ферменты «работают» в течение многих месяцев.

Существенный фактор, сопутствующий многим патологическим состояниям, - это активные формы кислорода, которые при чрезмерной их выработке могут способствовать гибели клеток и дегенерации тканей из-за повреждения множества компонентов клеток. В докладе обсуждаются подходы для доставки антиоксидантных ферментов и их эффекторов в мозг или глаз для лечения нейродегенеративных или воспалительных заболеваний.

В целом, представленные в докладе результаты показывают новые возможности в создании систем доставки ферментов (терапевтических белков) и их эффекторов для медицинской практики.

Работа частично выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 22-13-00261, на оборудовании, купленном, в том числе, с помощью Программы развития МГУ.

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА SARS-CoV-2: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Кочетков С.Н.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской Академии Наук,
119991, Москва, ул. Вавилова 32,
e-mail: kochetkoffsergej@yandex.ru

Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2 унесла жизни почти 7 млн. человек по всему миру. Хотя к настоящему моменту пандемия COVID-19 пошла на спад, это заболевание остается одной из основных проблем мирового здравоохранения. Сейчас уже очевидно, что магистральным путем борьбы с COVID-19 является массовая вакцинация, однако не менее важным является создание специфичных и эффективных противовирусных препаратов, действие которых направлено на блокирование жизненного цикла SARS-CoV-2. Мишенями для таких препаратов являются в первую очередь ключевые ферменты вируса. Это вирусные протеазы, осуществляющие специфическое расщепление полипротеина-предшественника, образующегося в результате трансляции вирусной РНК, а также РНК-зависимая РНК-полимераза, осуществляющая в составе вирусного репликационного комплекса репликацию и транскрипцию РНК. Применение лекарственных препаратов на основе ингибиторов этих ферментов – магистральный путь для лечения людей в первую очередь при появлении первых симптомов и подтверждении диагноза, и показано прежде всего для пациентов с определенными хроническими заболеваниями. которым угрожает повышенный риск тяжелого течения болезни. Следует отметить, что очевидный прогресс в создании эффективных и безопасных лекарств на основе таких ингибиторов пока еще далек от завершения.

В докладе будут проведен анализ ситуации, сложившийся в настоящее время в данной области, приведены основные типы перспективных анти-КОВИД препаратов, а также рассмотрены молекулярные механизмы их действия.

ФЕРМЕНТЫ В РАЗВИТИИ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Курочкин И.Н.,[а,б] Еременко А.В.,[а] Васильева А.Д.,[а] Сиголаева Л.В.,[б] Евтушенко Е.Г.[а,б]

[а] Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук»,
119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4,
e-mail: inkurochkin@gmail.com
[б] Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Химический факультет,
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

В докладе рассмотрены наиболее яркие результаты в области электрохимической биосенсорики и спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР), которые были получены благодаря уникальным возможностям ферментативного катализа. Показана высокая чувствительность электрохимических биосенсорных систем, основанных на циклических ферментативных реакциях и рециркуляции субстрата, а также при использовании иммуномагнитной сепарации. Обсуждаются варианты существенного улучшения аналитических возможностей биосенсорного анализа за счет применения полимеров для эффективной модификации поверхности электродов и иммобилизации ферментов. Приведены данные, демонстрирующие использование ферментативных меток для расширения возможностей биоаналитических применений спектроскопии ГКР. Возможность высокочувствительного измерения активности ферментативных меток (пероксидазы, щелочной фосфатазы, β-галактозидазы) при помощи ГКР, по сути, открывает новую универсальную платформу для разработки методик иммунохимического определения различных антигенов. Особое внимание уделено рассмотрению принципов анализа посттрансляционных модификаций белков с использованием метода ГКР в тандеме с ферментативным гидролизом исследуемых биомакромолекул и применению методов машинного обучения для анализа получаемой многомерной спектральной информации. Приведены примеры использования полученных достижений для создания систем для анализа устойчивости к действию антибиотиков и безамплификационной детекции транскриптов и вирусной РНК.

Представленные результаты получены в рамках бюджетного финансирования по темам 122041400080-0, 121041500039-8, при финансовой поддержке РНФ, проект № 22-14-00213 и РФФИ, проект № 20-08-00657. В работе использовали оборудование, приобретенное по Программе развития МГУ.

РОЛЬ ПОЛИ(ADP-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗ В ПРОЦЕССАХ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОМА

Лаврик О.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, проспект Лаврентьева, 8
e-mail:lavrik@niboch.nsc.ru

Поли(ADP-рибозил)ирование белков, катализируемое поли(ADP-рибоза)полимеразами (PARP), в первую очередь PARP1, регулирует у высших эукариот такие важные процессы, как ремоделирование хроматина, репликацию, транскрипцию и репарацию ДНК. При взаимодействии с поврежденной ДНК PARP1 катализирует синтез полимера ADP-рибозы (PAR). PAR может быть присоединен к ядерным белкам-акцепторам или к самому PARP1. Этот процесс приводит к реорганизации хроматина и функциональных белковых комплексов, участвующих в процессах репарации ДНК. Механизмы репарации ДНК относятся к числу основных стратегий, обеспечивающих сохранение целостности генома в процессе жизнедеятельности клетки.

Мы полагаем, что PARP1 обеспечивает специфическую регуляцию репарации ДНК, модификации гистонов при ремоделировании хроматина, а также других PARP-зависимых процессов при участии взаимодействующих с PARP1 белков [1]. Будет рассмотрена роль XRCC1, PARP2 и их кооперации с PARP1 в регуляции репарации оснований, роль белков-партнеров PARP1 в репликации ДНК, а также роль содержащих неупорядоченные структурные домены РНК-связывающих белков в регуляции активности PARP1. Мультифункциональный РНК-связывающий белок YB-1 эффективно взаимодействует с PAR, является мишенью PAR-илирования, а также стимулирует активность PARP1 с участием С-концевого неупорядоченного домена [2]. Согласно предложенному механизму, YB-1 при экспрессии в опухолях может снижать действие антираковых препаратов – ингибиторов PARP. Другой важный партнер PARP1 – ядерный РНК/PAR-связывающий белок FUS, локализуется вблизи повреждений ДНК при активации PARP1. При взаимодействии FUS с PAR формируются немембранные компартменты, в которых концентрируется поврежденная ДНК, а также ферменты и факторы репарации, что повышает эффективность процесса репарации [3]. Еще один важнейший партнер PARP1/2 – недавно открытый фактор PAR-илирования гистонов HPF1, модулирует специфичность модификации белков по остаткам серина и стимулирует PAR-илирование гистонов [4]. Установленные взаимодействия PARP1/2 с белками-партнерами могут быть основой новой стратегии конструирования направленных ингибиторов PARP1/2, обеспечивающих специфическую регуляцию активности этих ферментов, а также эффективную и одновременно менее токсичную терапию онко – и нейродегенеративных заболеваний.

Литература
[1] Alemasova E.E., Lavrik O.I. *Nucleic Acids Res.*, 2019, **47**, 3811.
[2] Naumenko K.N., Sukhanova M.V., Hamon L., Kurgina T.A., Anarbaev R.O., Mangerich A., Pastré D., Lavrik O.I. *Front. Cell Dev. Biol*., 2022, **10**, 831741
[3] Singatulina A.S., Hamon L., Sukhanova M.V., Desforges B., Joshi V., Bouhss A., Lavrik O.I., Pastré D. *Cell Rep.*, 2019, **27**, 1809.
[4] Kurgina T.A., Moor N.A., Kutuzov M.M., Naumenko K.N., Ukraintsev A.A., Lavrik O.I. *Commun. Biol*., 2021, **4**, 1259.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 21-64-00017.

МОДУЛИРОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ, РЕГУЛЯТОРНЫХ И «ПОБОЧНЫХ» ФУНКЦИЙ ФЕРМЕНТОВ ПРИ МОДИФИКАЦИИ СУЛЬФГИДРИЛЬНЫХ ГРУПП АКТИВНОГО ЦЕНТРА

Муронец В.И.,[а,б] **Медведева М.В.,**[б] **Баринова К.В.,**[а] **Шмальгаузен Е.В.** [а]

[а] *НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и*
[б] *Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.40*
e.mail: vimuronets@belozersky.msu.ru

Сульфгидрильные группы ферментов являются одной из важнейших мишеней их посттрансляционных модификаций. Наиболее изучено окисление цистеиновых остатков белков разнообразными активными формами кислорода. При такой модификации возникают цистеин-сульфеновая, цистеин-сульфиновая и цистеин-сульфоновая кислоты, что приводит к инактивации ферментов, обладающих важными для катализа сульфгидрильными группами. Однако окисление SH-групп может вызывать появление новой ферментативной активности, нехарактерной для исходного белка, а также участвовать в регуляции сигнальных путей. Не менее важно для функционирования живых систем S-глутатионилирование и S-нитрозилирование ферментов. При таких модификациях также происходит инактивация ферментов, однако существенным отличием от глубокого окисления сульфгидрильных групп активными формами кислорода, является обратимость данного процесса. В определенной степени можно считать, что S-нитрозилирование и, особенно, S-глутатионилирование ферментов защищает ферменты от необратимой инактивации. Все трем типам посттрансляционной модификации прежде всего подвергаются те ферменты, сульфгидрильные группы цистеиновых остатки которых обладают высокой реакционной способностью из-за особенностей микроокружения. К числу таких ферментов относится глицеральдегид-3- фосфатдегидрогеназы (ГАФД), которая не только содержит такой цистеиновый остаток в активном центре, но и присутствует во всех типах клеток в очень высокой концентрации. По этой причине ГАФД может служить одной из защитных систем от действия активных форм кислорода, окиси азота и других соединений. В нашей работе мы провели подробный сравнительный анализ влияния окисления, S-глутатионилирования и S-нитрозилирования ГАФД на ее дегидрогеназную активность, на появление дополнительной ацилфосфатазной активности, а также на структурные характеристики. Были идентифицированы модифицированные остатки, появляющиеся при разных типах воздействия, проверена возможность модификации второго остатка цистеина активного центра, который не участвует в каталитическом акте, и выяснено влияние окисления на расположение двух остатков цистеина в активном центре с помощью метода рентгеноструктурного анализа. Особое внимание было уделено анализу гипотез о влиянии модификаций цистеиновых остатков ГАФД на индукцию апоптоза и связанному с этим явлением участию ГАФД в патологических процессах. В частности, рассмотрена взаимосвязь нитрозилирования и болезни Паркинсона, поскольку ГАФД и взаимодействующий с ней альфа-синуклеи непосредственно вовлечены в патологические процессы, вызывающие это заболевание.

Литература
1.Muronetz V.I. et al. *Biomolecules.* 2021,**11(11),**1656.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект No 21-14-00037.

МИЕЛОПЕРОКСИДАЗА ЛЕЙКОЦИТОВ КАТАЛИЗИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНИЦИАТОРОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ ЛИПИДОВ

Панасенко О.М.

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА,
119435, Москва, малая Пироговская ул., 1а
e-mail: o-panas@mail.ru

В лейкоцитах человека присутствует фермент миелопероксидаза (донор: H_2O_2-оксидоредуктаза, КФ 1.11.2.2), который катализирует образование активных форм галогенов (АФГ, главным образом, HOCl и HOBr), являющихся сильными окислителями и галогенирующими агентами, повреждающими практически все классы биологически важных молекул (белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы и др.), что приводит к развитию окислительного/галогенирующего стресса [1]. В докладе показано, что АФГ способны индуцировать классическую цепную свободнорадикальную пероксидацию липидов (ПОЛ), протекающую через стадии инициирования, продолжения, разветвления и обрыва цепи. Установлено, что АФГ проникают в липидную фазу белок-липидных структур, вызывают деструкцию антиоксидантов, снижают устойчивость липидной фазы к окислению. Это сопровождается убылью числа ненасыщенных связей в ацильных цепях липидов и одновременно накоплением продукты ПОЛ: гидропероксидов, диеновых конъюгатов, карбонильных соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, флуоресцирующих продуктов типа оснований Шиффа. Ловушки свободных радикалов (α-токоферол и 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол) в микромолярных концентрациях полностью блокируют выход перечисленных выше продуктов [2], доказывая свободнорадикальный механизм ПОЛ в присутствии АФГ. Наиболее вероятными реакциями, претендующими на стадию инициирования АФГ-нидуцированной ПОЛ, являются реакции HOCl с нитритом [3] и NH_2-группами [4], в которых образуются свободные радикалы. HOCl реагирует с гидропероксидами липидов (LOOH) с образованием пероксильного ($LOO^{\bullet}$) и алкоксильного ($LO^{\bullet}$) радикалов [5]:

$$HOCl + LOOH \rightarrow LOO^{\bullet} + H_2O + Cl^{-},\ 2LOO^{\bullet} \rightarrow 2LO^{\bullet} + O_2.$$

Через эти реакции реализуется стадия разветвления цепей АФГ-индуцированной ПОЛ.

В докладе подробно и всесторонне обсуждается механизм АФГ-индуцированной ПОЛ, а также рассмотрены примеры, свидетельствующие о причастности миелопероксидазы и продуцируемых ею АФГ к развитию социально-значимых заболеваний человека, ассоциированных с воспалением: сахарного диабета, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и др.

Литература
1. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. *Успехи биол. химии*, 2013, **53**, 195.
2. Панасенко О.М., Арнхольд Ю. *Биол. мембраны*, 1996, **13**, 89.
3. Panasenko O.M., Briviba K., Klotz L.-O., Sies H. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997, **343**, 254.
4. Hazell L.J., Davies M.J., Stocker R. Biochemical *J.,* 1999, **339**, 489.
5. Чеканов А.В., Осипов А.Н., Владимиров Ю.А., Сергиенко В.И., Панасенко О.М. *Биофизика*, 2007, **52**, 5.

Работа выполнена при поддержке РНФ, проекты 20-15-00390 и 23-45-10026.

ЯМР ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Польшаков В.И.

Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В.Ломоносова,
Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, к. 1
vpolsha@fbm.msu.ru;

Спектроскопия ЯМР является одним из важнейших биофизических методов, предоставляющих уникальную информацию о строении белков в растворе, их динамических свойствах, а также о межмолекулярных взаимодействиях, в которых они участвуют. Методы ЯМР скрининга позволяют детектировать специфическое взаимодействие низкомолекулярных соединений с белками и получать информацию о центре их связывания. В докладе представлены результаты изучения методами спектроскопии ЯМР нескольких ферментов, представляющих интерес в качестве лекарственных мишеней. Получена информация о структуре и динамических свойствах в растворе метилтрансферазы WBSCR27, ассоциированной с синдромом Вильямса-Бойрена [1]. Исследованы особенности связывания кофактора S-аденозил-L-метионина и его аналогов с этим ферментом [2]. Выполнено отнесение сигналов ЯМР в спектрах неорганической пирофосфатазы из *Mycobacterium tuberculosis* (гексамер, 105 кДа) [3] и формиатдегидрогеназы *Staphylococcus aureus* (димер 84 кДа). Для этих белков, существенно превышающих по размеру объекты, исследуемые традиционными методами ЯМР, были разработаны оптимальные методы изотопного обогащения, позволившие получить спектры высокого качества. Методами ЯМР скрининга проведен поиск потенциальных ингибиторов этих бактериальных ферментов. Методы ЯМР скрининга были также использованы для поиска ингибиторов метионин-γ-лиазы бактерий *Citrobacter freundii*. С помощью метода WaterLOGSY для двух соединений лидеров были определены константы связывания с ферментом [4].

Литература**:**

1. Mariasina, S.S., Chang, C.-F., Navalayev, T.I., Chugunova, A.A., Efimov, S.V., Zgoda, V.G., Ivlev, V.A., Dontsova, O.A., Sergiev, P.V., Polshakov, V.I. (2022) Williams-Beuren syndrome related methyltransferase WBSCR27: from structure to possible function, *Front Mol Biosciences*, **9** (865743), 1-15. DOI: 10.3389/fmolb.2022.865743.
2. Mariasina, S.S., Chang, C.-F. Petrova, O.A., Efimov, S.V., Klochkov, V.V., Kechko, O.I., Mitkevich, V.A., Sergiev, P.V., Dontsova, O.A., Polshakov, V.I. (2020) Williams–Beuren syndrome-related methyltransferase WBSCR27: cofactor binding and cleavage. *FEBS J*, **287**(24): 5375-5393.
3. Romanov, R.S., Mariasina, S.S., Efimov, S.V., Klochkov, V.V., Rodina, E.V., Polshakov, V.I. (2020) Backbone resonance assignment and dynamics of 110 kDa hexameric inorganic pyrophosphatase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomol NMR Assign*, **14**(2), 281-287.
4. Батуев, Е.А., Лизунов, А.Ю., Морозова, Е.А., Клочков, В.В., Ануфриева, Н.В., Демидкина, Т.В., Польшаков, В.И. (2014) ЯМР скрининг потенциальных ингибиторов *Citrobacter freundii* метионин γ-лиазы, Мол. Биол., **48**. № 6, 1019-1029.

Исследование поддержано грантом РНФ № 19-14-00115.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКСПРЕСИОННОЙ ПЛАТФОРМЫ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ КОРМОВЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Синицын А.П.[1,2], Синицына О.А.[1], Рожкова А.М.[1,2], Зоров И.Н.[1,2], Телицин В.Д.[1], Короткова О.Г.[2], Рубцова Е.А.[2], Кондратьева Е.Г.[2], Семёнова М.В.[2], Доценко А.С.[2], Осипов Д.О.[2], Денисенко Ю.А.[2], Синельников И.Г.[2], Кислицин В.Ю.[2], Чулкин А.М.[2], Савинова О.С.[2], Шашков И.А.[2], Сатрутдинов А.Д.[2]

[1] Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Ленинские горы, 1-11Б
[2] ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Ленинский пр-т, 33-2
apsinistyn@gmail.com

Зерно злаковых культур, широко используемое для производства кормов в животноводстве и птицеводстве (пшеница, рожь, овес, ячмень), помимо питательных веществ (крахмал, белки) содержит также от 13 до 15% некрахмальных полисахаридов (НПС), таких как целлюлоза, β-глюканы и ксиланы. НПС являются антипитательным фактором, оказывающим отрицательное воздействие на усвоение кормов за счёт набухания и образования гелеобразных субстанций, затрудняющих доступ пищеварительных ферментов к питательным веществам и массообмен в кишечнике. Моногастричные животные и птица не имеют собственных ферментов, способных эффективно расщеплять НПС, поэтому в кормопроизводстве в качестве добавок используют ферментные препараты (ФП), в состав которых входят целлюлазы, β-глюканазы и ксиланазы. Это позволяет снизить вязкость содержимого кишечника и повысить усвояемость питательных веществ за счет ферментативного расщепления НПС.

На платформе системы экспрессии генов микроскопического гриба *Penicillium verruculosum* мы создали новые высокопродуктивные рекомбинантные штаммы микроорганизмов, которые производят ряд кормовых ФП нового поколения, включающих сбалансированный комплекс кормовых карбогидраз (с низким содержанием «балластных» ферментов), обладающих высокой молекулярной активностью по отношению к НПС, повышенной устойчивостью к высоким температурам, и не подвержены ингибированию белковыми ингибиторами злаков. Кормовые ФП «Агроцелл Плюс», «Агроксил Плюс» и «Агроксил Премиум» выпускаются в настоящее время заводом «Агрофермент» и успешно применяются для кормления цыплят-бройлеров и поросят.

Фитаты являются запасным соединением фосфора в семенах высших растений. Из-за низкой фитазной активности в пищеварительном тракте животных и птицы эта форма фосфора является для них малодоступной – в результате основная часть фосфора (50-70%), входящего в состав кормов растительного происхождения, не усваивается. Фитаза гидролизует фитаты до неорганического фосфата и широко используется в качестве кормовой добавки для повышения пищевой ценности кормов. Нами получен высокоактивный рекомбинантный штамм *P. verruculosum* – продуцент гетерологичной фитазы, который используется на заводе «Агрофермент» для производства ФП «Агрофит», кроме того, производится также ФП «Агрофит Про», представляющий собой смесь препаратов фитазы и НПС-активных ферментов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственное задание #122041100066-7).

ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА: ОТ РЕГЕНЕРАЦИИ NAD(P)H ДО ФЕРМЕНТА-МИШЕНИ В ПАТОГЕНАХ, КОМПОНЕНТА НОВЫХ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ГИБРИДНЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ И БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ ФИКСАЦИИ CO_2 ИЗ АТМОСФЕРЫ

Тишков В.И.[1,2,3]а **Пометун А.А.** [1,2,3],[б] **Савин С.С.** [1,3]

Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия
Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ БИОТЕХНОЛОГИИ РАН, Москва, Россия
[2]ООО «Инновации и высокие технологии МГУ, 109559 Москва, Россия
e-mail: tishkovvi@my.msu.ru

В 1974 году на химическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова была организована новая кафедра – кафедра химической энзимологии. В процессе создания основателем кафедры чл.-корр. АН СССР, профессором И.В. Березиным был сформирован коллектив из молодых, амбициозных и талантливых учёных. Тогда же в начале 70-х годов на кафедре были начаты исследования новых ферментов. Обзоры по эволюции и достижениям в исследовании некоторых ферментов, выполненных на кафедре химической энзимологии в сотрудничестве с другими организациями, можно найти в специальных тематических номерах - 2, 4 и 5, Вестникв Московского университета. Серия 2. Химия, 2023 по современным достижениям биокатализа. Одним из таких ферментов стала NAD+-зависимая формиатдегидрогеназа из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH), в то время как остальной мир выбрал для получения формиатдегидрогеназы метанолутилизирующие дрожжи. Выбор учёных МГУ источника фермента оказался настолько удачливым, что PseFDH даже по прошествии 50 лет превосходит все описанные на настоящий момент FDH по каталитических параметрам, термостабильности и устойчивости к органически растворителям. Отметим некоторые самые важные направления исследования и применения PseFDH.

PseFDH является членом очень большого суперспмейства D-специфичных дегидрогеназ 2-оксикислот. В силу простоты катализируемой реакции – это модельный фермент для исследования основных закономерностей механизма действия ферментов этого суперсемейства. Для выяснения взаимосвязи структура-функция были клонированы гены FDH из разных источников и в сотрудничестве с лабораторией В.О.Попова методом РСА определены их трехмерные структуры. Кристаллы некоторых FDH были получены в космосе.

Реакция, катализирумая FDH, является практически необратимой, фермент абсолютно специфичен к формиату, имеет постоянные значения k_{cat} и K_M в диапазоне pH 5.5-10.0/ Дешевизна формиата, отсутствие ингибирования им большинства ферментов (есть только одно исключение) и простота удаления из системы продукта реакции CO_2 привели к тому, что с 1981 г. FDH стала одним из основных ферментов для регенерации NADH в процессах тонкого органического (в первую очередь хирального) синтеза с помощью оксидоредуктаз. Например, процесс получения L-*трет*-лейцина с участием FDH, реализованный фирмой Degussa в середине 90-х годов прошлого века, до сих пор остается самым крупнотоннажным процессом хирального синтеза с участием смеси индивидуальных ферментов. Получение в нашей лаборатории в 1993 г. мутантной $NADP^+$-специфичной PseFDH инициировало очень большое количество работ по хиральному синтезу с регенерацией NADPH. Имеющиеся в настоящее время у зарубежных коллег препараты $NADP^+$-FDH по своим свойствам соответствуют вариантам $NADP^+$-PseFDH, полученным в нашей лаборатории еще 20 лет назад, в то время как в нашей лаборатории получены улучшенные мутанты второго и тертьеого поколений.

PseFDH была первой бактериальной FDH, ген которой был клонирован и экспрессирован в клетках *E.coli*. Нами был получены штаммы-суперпродуценты разных вариантов рекомбинантной PseFD и разработан процесс ихо культивирования в ферментере объемом до 400 л. Одно культивирование позволило получить более 11 миллионов ед. активности, что соответствует 5-летней потребности фирмы Degussa. Процедура очистки позволяет получить препараты 80% чистоты и выходом по активности 90% без использования хроматограии. Методом рационального дизайна получены мутантные варианты с повышенной температурной и химической стабильностью. Препараты фермента могут храниться более 15 лет при +4 °С без потери активности.

В растениях FDH локализована в митохондриях и при стрессовых воздействиях ее соедражние достигает 10% всех митохондриальных белков.Низколе содеражние фермента не позволяло проводить его систематические исследования. Нами впервые в мире были получены в *E,coli* рекомбинантные растительные FDH из *Arabidopsis thaliana* и сои *Glycine max.* Были получены мутантные формы с повышенной каталитической активностью (до 2х ра) и термостабильностью. Поскольку NADHб синтезируемый FDH в митохондриях необходим для ликвидации последствий стресса, замена природных генов FDH на мутантые порзволит повысить эффективность синтеза NADH в два раза без дополнительной нагрузки клетки на синтез самих ферментов, т.е. такой подход позволит получить растения с повышенной стрессоустойчивостью.

Гены ABP были найдены практических по всех патоенах и в них FDH также является белком стресса. При переходе *Staphylococcus aureus* из состояния планктона в биопленки уровень биосинтеза FDH возрастает в 20 ра, а уровень мРНК фермента занимает 3е место. SauFDH имеет гомологию с другими FDH не более 40% и фермент представляет отдельную ветвь эволюции FDH. Ген SauFDH был нами клонирован и экспрессирован в E.coli. Оказалось, что удельная активность SauFDH в два раза выше остальных FDH, а по термостабильности уступает только PseFDH. В настоящее время совместно с В.И.Польшаковым проводятся эксперименты по определению структуры SauFDH с помощью ЯМР и поиск ингибиторов, которые являются потенцальными препаратами против биопленок стафилококков.

NAD+/NADH является важнейшим коферментом, который используют более тысячи дегидрогеназ. Соотношение концентраций NAD+/NADH в норме и патологии значимо отличается и может быть использован для диагностики различных заболеваний. Нами был разработан селективный метод определения NAD^+ на фоне NADH, $NADP^+$и NADPH. Было показано значительное изенение концентраций кофермента при нейро- и кардио- заболеваниях. В данном методебыла использована FDH, клонированная нами из термотолерантных дрожжей *Oataea parapolymorpha* DL-1 (OpaFDH). Оказалось, что OpaFDH имеет самую высокую термостабильность среди эукариотиченских FDH.

Одним изз современных направлений по jgdsityb. Эффективности биокатализаторов является получение гибридных катализаторов, в которых два (и более) фермента, катализирующих сопряженные реакции, объединены в одну полипептидную цепь. Нами были получены различные химерные каталихаторы мутантной NAD+- специфичной PseFDH с монооксигеназой CYP102A1 BM3 (P450) и фенилацетонмонооксигеназы из *Thermobifida fusca*. Гибридные ферменты продемонстрировали эффективность, которая превышала таковую для простой смеси ферментов до 70 раз. Химера PseFD-P450 имела последовательность более, чем из 1600 ак остатков и является самым большим слитым ферментом в мире.

PseFDH проявляет уникальную стабильность против инактивации протеазами и органическими растворителями. Фермент не инактивировался даже на разделе фаз вода-гептан. Исследование свойств различных FDH в ионных жидкостях показало перспективносить применения таких растворителей для конверсии плохо растворимы в воде соединений.

В последние 10 лет наблюдается бум в исследованиях по биокаталитической фиксации CO2 из атмосферы. Одним из ферментов, который активно используется, является FDH. Рассмотрены перспективы работ в данном направлении.

Работа выполнена в рамках государственного задания, а также грантов РФФИ, РНФ, Фонда Александра фон Гумбольдта, INTAS, Госконтрактов Минобрнауки и др. и

ЛЮЦИФЕРАЗА СВЕТЛЯКОВ *LIUCIOLA MINGRELICA*. ИСТОРИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

Угарова Н.Н.

Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова,
Москва, 119992, Ленинские Горы, МГУ, 1/3
nugarova@gmail.com

Исследования люциферин-люциферазной системы светляков *Luciola mingrelica* начались на кафедре химической энзимологии в середине 70-х годов прошлого века по инициативе первого заведующего кафедрой Ильи Васильевича Березина. Это было совершенно новое в нашей стране научное направление, в развитии которого самое активное и плодотворное участие принимали многие студенты, аспиранты и молодые сотрудники нашей научной группы. На первом этапе были отработаны методы сбора и консервации лампочек светляков. Были получены высокоочищенные препараты фермента, описаны его биохимические и кинетические свойства, спектры биолюминесценции в широком интервале pH. На основании проведенных исследований флуоресцентных свойств продукта реакции – оксилюциферина и его аналогов - были предложены возможные формы эмиттера при различных pH. Впервые было показано, что в состав препаратов нативной люциферазы светляков входят фосфолипиды, удаление которых приводит к снижению активности и стабильности фермента. Были разработаны и запатентованы методы иммобилизации и стабилизации люциферазы, на основании которых был создан и успешно использован препарат Иммолюм для высокочувствительной и быстрой детекции микробной обсемененности различных технических материалов, инфицированных ран и для экспресс-анализа чувствительности антибиотиков для лечения инфицированных ран пациентов.

Начиная с середины 80-х годов, на кафедре были проведены работы по клонированию люциферазы светляков *Luciola mingrelica*. В вначале 90-х годов в нашей стране был получен первый рекомбинантный фермент - люцифераза светляков *Luciola mingrelica.* Этот фермент по первичной последовательности оказался близким к другим люциферазам рода *Luciola*, клонированным в Японии (более 80% гомологии), но отличался от ранее изученной люциферазы из американских светляков *Photinus pyralias* (65% гомологии).

Методами генетической инженерии, компьютерного моделирования и сайт- специфического мутагенеза была выяснена роль динамической структуры фермента в сложном, трехстадийном окислении субстрата люциферина, экспериментально была обоснована структура эмиттера в люциферин-люциферазной системе светляков.

Генетические методы случайного и сайт-специфического мутагенеза, методы направленной эволюции были эффективно использованы для создания большого семейства мутантных люцифераз *Luciola mingrelica*, различающихся по активности, pH-зависимости спектров биолюминесценции, термостабильности. Большую практическую ценность представляет высокоактивный и термостабильный (TS) мутант люциферазы *Luciola mingrelica*, который до сих пор широко используется в биолюминесцентном анализе многими исследователями в нашей стране.

Таким образом, благодаря инициативе первого заведующего кафедрой Ильи Васильевича Березина наш коллектив стал единственным, уникальным в нашей стране центром по изучению и практическому использованию люциферазы светляков *Luciola mingrelica* и приобрел широкую известность среди специалистов всего мира, работающих в области биолюминесценции.

Работа выполнена в рамках госрегистрационной темы МГУ имени М.В. Ломоносова Номер ЦИТИС: 121041500039-8.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНАКТИВАЦИИ АНТИБИОТИКОВ МЕТАЛЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗАМИ И ПЕНИЦИЛЛИН-СВЯЗЫВАЮЩИМИ БЕЛКАМИ И ИНГИБИРОВАНИЕ ЭТИХ ФЕРМЕНТОВ

Хренова М.Г.[а,б]

[а]ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2,
mkhrenova@lcc.chem.msu.ru
[б]МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр.3.

Антибиотикорезистентность – острая проблема современного здравоохранения. Среди множества механизмов стоит выделить ферментативные процессы инактивации антибиотиков путем гидролиза их β-лактамного кольца. Эту реакцию проводят β-лактамазы – ферменты класса гидролаз, содержащие в своем активном центре аминокислотный остаток серина в качестве нуклеофила или гидроксид-анион в металл-зависимых ферментах. Однако возможны и другие механизмы развития резистентности. Исходно β-лактамные соединения проявили свою антибактериальную активность, поскольку были структурно похожи на D-аминокислоты, необходимые для строительства клеточной стенки бактерий с участием пенициллин-связывающих белков. При этом возникающие мутации в генах, кодирующих эти белки, также привели к изменению механизма их взаимодействия с β-лактамными соединениями. Одним из развивающихся подходов к поиску ингибиторов белковых мишеней является репозиционирование уже применяющихся терапевтических средств. В докладе это будет продемонстрировано на примере лекарства унитола, используемого при отравлении тяжелыми металлами.

Молекулярные механизмы инактивации β-лактамных антибиотиков металло-β-лактамазами, их ингибирование унитиолом, а также механизмы взаимодействия антибиотиков с пенициллин-связывающими белками из различных бактериальных штаммов будут представлены в докладе. Результаты получены методом молекулярной динамики с классическими и комбинированными потенциалами квантовой механики / молекулярной механики. Также в работе использовались методы динамического сетевого анализа для характеризации классических траекторий и методы анализа электронной плотности в активных центрах изучаемых ферментов для описания особенностей их взаимодействия с антибиотиками и ингибиторами.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗ: ОТ КИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ДО БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СЕМЕЙСТВА И МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Швядас В.К.[1,2], Панин Н.В.[2,3], Гуранда Д.Ф.[3], Никулин М.В.[3], Кирилин Е.М.[2,3]

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, с. 73.
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский вычислительный центр, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, с. 4.
[3]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, с. 40.
Автор, ответственный за переписку: Витас Швядас, vytas@belozersky.msu.ru

Семейство пенициллинацилаз представляет уникальный пример ферментов, которые были найдены и уже более шестидесяти лет используются в медицинской промышленности, хотя их роль в живых системах до последнего времени нельзя считать установленной. Благодаря промышленному применению уникальных каталитических свойств пенициллинацилаз полусинтетические пенициллины и цефалоспорины стали наиболее широко используемыми и доступными антибиотиками. Пенициллинацилазы также стали первым представителем Ntn-гидролаз – ферментов с ранее неизвестным механизмом действия, который привлекает внимание как с фундаментальной, так и с практической точки зрения. В докладе будет рассмотрен вклад работ, выполненных в научной школе Ильи Васильевича Березина, в изучение каталитического механизма, кинетики и термодинамики реакций, катализируемых пенициллинацилазами, обратимость ферментативного гидролиза ряда пенициллинов, цефалоспоринов и родственных соединений, влияние β-лактамного кольца на термодинамику синтеза новых пенициллинов и цефалоспоринов путем прямой конденсации и в результате ацильного переноса, вопросы оптимизации условий ферментативного ацильного переноса и использования пересыщенных растворов реагентов [1]. На основе результатов, полученных при использовании методов биоинформатики [2], молекулярного моделирования и интегральной кинетики, будут обсуждены особенности узнавания ферментами этого семейства своих субстратов, их доставки в активный центр, наличие ранее неизвестных участков связывания в структуре белка и возможности проявления альтернативных (мунлайтинговых) активностей, роль аминокислотных остатков в механизме действия. Будут рассмотрены роль хромогенных субстратов в изучении субстратной специфичности пенициллинацилаз, опыт применения методов титрования активных центров в биоинженерии пенициллинацилаз, а также новые области практического применения ферментов семейства: от создания «умных» катализаторов на основе конъюгатов со стимул-чувствительными полимерами до получения индивидуальных энантиомеров аминосоединений и синтеза мономеров для получения биодеградируемых полимеров.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 21-71-30003)

Литература
1.Панин Н.В., Гуранда Д.Ф., Шаповалова И.В., Швядас В.К. Пенициллинацилаза: ретроспектива изучения кинетики и термодинамики практически значимых реакций // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 64. № 4.
2.Веб-серверы: Mustguseal https://biokinet.belozersky.msu.ru/mustguseal, visualCMAT https://biokinet.belozersky.msu.ru/visualcmat, Zebra https://biokinet.belozersky.msu.ru/zebra2, pocketZebra https://biokinet.belozersky.msu.ru/pocketzebra

BIOCATALYTIC PROCESSES IN ENZYME NANOREACTORS

Patrick Masson[1*], Zukhra Shajudtinova[1,2], Tatiana Pashirova[2]

[1] Kazan Federal University, Biochemical Neuropharmacology Laboratory, Kremlevskaya str., 18, Kazan, 420111, Russian Federation;
[2] Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Arbuzov str., 8, Kazan, 420088, Russian Federation
**pym.masson@free.fr*

Enzymatic nanoreactors are enzyme-encapsulated nanobodies capable of performing single or cascade reactions either for biosynthesis or for degradation of substrates (1). The most sophisticated nanodevices, called nanorobots, capable of performing mechanical and surgical tasks, are just emerging from SciFi (2). Our talk focuses on simple therapeutic enzyme nanoreactors to be used for *in vivo* neutralization of toxicants, with a special reference to inactivation of organophosphorous compounds (OP).

Therapeutic enzymes that detoxify OPs are bioscavengers, acting either as stoichiometric, pseudocatalytic or catalytic traps (3). Encapsulation of bioscavengers in nanoparticles was first intended to overcome the fast clearance and immune response after injection of heterologous therapeutic enzymes. The aim of enzyme encapsulation into nanoreactors is also to provide a high concentration of reactive enzyme in stable nanocontainers. Knowledge of the concentration of encapsulated enzyme is an important issue in mastering nanoreactor functioning. Under injectable nanoreactor conditions, the toxicant present in the bloodstream diffuses across the nanoreactor membrane, and the enzyme-mediated detoxification reaction takes place inside the sealed compartment (4). The enzyme concentration (E) inside the nanobody can be either lower or much higher than the toxicant one (T). Then, the reaction occurs inside the nanoreactor either under first ((E)<<(T)) or second order conditions ((E) ≅ (T)) with respect to toxicant concentration (T). The rate of detoxification depends on both the bimolecular rate constant of the reaction and the concentration of encapsulated enzyme. However, possible partial encapsulation of enzyme may occur. The existence of an enzyme corona on the outer surface of nanoreactors complicates the process and may lead to fast clearance and adverse immune responses to heterologous enzymes. The importance of nanoreactor membrane permeability to substrates and reaction products, possible osmotic, viscosity and crowding effects, and corona formation are examined. All these issues are illustrated by recent published and unpublished works of the authors about *in vivo* detoxification of OPs (5).

Supported by RNF # 20-14-00155-P.

Ref: (1) K. Chauhan et al., ChemCatChem (2021) 13, 3732-3748; (2) T. Pashirova et al., Acta Naturae (2023) 15(1), 4-12; (3) P. Masson & S.L. Lushchekina, Chem. Biol. Interact. (2016) 259, 319-326; (4) Z. Shajhutdinova et al., Biomedicine (2022) 10, 784; (5) T. Pashirova et al., ACS Appl. Mat & Interfaces (2022) 14, 19241-19252.



УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

НОВЫЕ ХИМЕРНЫЕ БЕЛКИ С УЧАСТИЕМ КИНАЗ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ОНКОГЕНЫ

Айсин К.Н.[а], Марьясина С.С.[а,б], Загребин Ф.А.[в], Сергиев П.В.[а,б]

[а] МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет,
119991, Россия, Москва, Ленинские горы, 1с3
e-mail: kamilaysin@yandex.ru
[б] МГУ имени М.В. Ломоносова, Институт функциональной геномики,
119204, Россия, Москва, Ленинские горы, 1с73
[в] ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России
197758, Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

Протеинкиназы являются хорошо известными онкогенами. Постоянно растёт число описанных драйверных мутаций в генах протеинкиназ, и это вносит свой позитивный вклад в развитие методов, направленных на борьбу с онкологическими заболеваниями.

Частой причиной малигнизации соматических клеток являются хромосомные перестройки, ведущие к образованию гибридных генов. Классический пример мутации, ведущей к онкогенезу, – «филадельфийская хромосома», которую можно обнаружить у 95% больных хроническим миелоидным лейкозом[1]. В этом случае нестабильный участок 22-ой хромосомы (ген BCR – Breakpoint Cluster Region) соединяется с небольшим участком 9-ой хромосомы в локусе гена ABL1. Ген BCR кодирует протеинкиназу. Образующийся в результате мутации химерный белок BCR-ABL сохраняет ферментативную активность и является драйвером малигнизации клеток[2]. Остается загадкой – почему 22-ая хромосома нестабильна именно в локусе BCR – описано свыше двух десятков химерных белков с участием этой киназы3.

В данной работе изучается потенциальная онкогенность четырех химерных белков, в каждом из которых присутствует киназа: BCR-PKHD, RPS6KB1-CLTC, CDC42BPG-ATG2A, MAPRE1-DGKB. Данные химерные гены и приведшие к ним хромосомные перестройки были обнаружены в результате полнотранскриптомного секвенирования тканевых эксплантов четырех пациентов с диагностированной карциномой легкого, у которых проверка на все известные драйверные мутации дала отрицательный результат. Цель настоящего исследования – показать способность перечисленных гибридных белков вызывать злокачественное перерождение клеток (или доказать обратное).

Литература
1. Druker B. J. *Oncogene*, 2002, **21**, 56.
2. Klein F., Feldhahn N., Müschen M. *Cell Cycle*, 2004, **3**, 7.
3. Peiris M.N., Li F., Donoghue D.J., 2019, **10**, 28

Работа выполняется при финансовой поддержке РНФ, проект 17-75-30027.

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ЦЕЛЛЮЛОЗНО-БУМАЖНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ: ОПЫТ ВНЕДРЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Аксёнов А.С., Майорова К.А., Шевченко А.Р., Родичева М.А., Акишин Д.А.

Северный (Арктический) федеральный университет имени М. В. Ломоносова
ул. Набережная Северной Двины, 17, Архангельск, 163002
E-mail: a.s.aksenov@narfu.ru

С 1980-х годов отмечается интерес в использовании биокатализаторов со стороны мировой целлюлозно-бумажной промышленности, а уже в начале 2000-х годов стадия ксиланазной обработки целлюлозной массы перед отбелкой внедрена на предприятиях северо-запада Российской Федерации. Работы проводились под руководством профессора Е. В. Новожилова в Архангельской области. Успешный опыт дал толчок в развитии отечественных прикладных исследований, посвященных возможности применения других ферментов в процессах переработки целлюлозно-бумажных материалов: целлюлаз (в большей степени эндоглюканаз), амилаз, липаз. Селективное воздействие на многокомпонентный субстрат обуславливает преимущества биокатализаторов в сравнении с некоторыми химикатами при производстве механической массы, бумаги и картона из целлюлозы и макулатуры, получении волокнистых полуфабрикатов [1].

Благодаря относительной простоте и эффективности ксиланазная стадия в производстве беленых сульфатных целлюлоз применяется уже более 20 лет на некоторых российских ЦБК. Частичное удаление ксилана, адсорбированного на поверхности волокон, а также находящегося внутри клеточных стенок, в результате ферментативного гидролиза эндоксиланазами обеспечивает улучшение белимости целлюлозы. Немногочисленные опытно-промышленные испытания отечественных препаратов ксиланаз показали хорошие результаты, однако их внедрение в производство не последовало. Подбор доступного биокатализатора, адаптированного к условиям производства сульфатной целлюлозы, в сочетании с оптимизацией всего процесса получения беленых полуфабрикатов может стать новым драйвером развития биотехнологий в химико-лесном комплексе.

Ферментные технологии в целлюлозно-бумажной промышленности не ограничиваются только совершенствованием существующих производств. Процессы глубокой биокаталитической деструкции целлюлозы и гемицеллюлоз волокнистых полуфабрикатов пока не нашли применения, но актуальны для получения растворов сахаров (преимущественно глюкозы) и новых полимерных продуктов.

Внедрение отечественных биокатализаторов в целлюлозно-бумажную промышленность при создании востребованных видов продукции возможно только благодаря совместным усилиям опытных химиков-технологов отрасли с ведущими энзимологами при наличии федеральных или региональных инструментов поддержки.

Литература
[1] Новожилов Е.В. Применение ферментных технологий в целлюлозно-бумажной промышленности: моногр. Архангельск: САФУ, 2013. 364 с.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 22-24-20136.

ДИНАМИКА СТРУКТУРЫ В КАТАЛИЗЕ И РЕГУЛЯЦИИ РАСТВОРИМОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ

Анашкин В.А., Замахов И.М., Байков А.А.

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 40,
e-mail: victor_anashkin@genebee.msu.ru

Пирофосфат (PP_i) является побочным продуктом около 200 биосинтетических реакций, в которых нуклеозидтрифосфаты превращаются в нуклеозидмонофосфаты и PP_i. Будучи продуктом этих реакций, PP_i ингибирует многие из них и поэтому является важнейшим клеточным регулятором. Поскольку PP_i не вступает в метаболические процессы, его уровень регулируется в большинстве клеток посредством гидролиза до метаболизируемого фосфата под действием фермента – неорганической пирофосфатазы. Наиболее интересна регулируемая разновидность этого фермента (CBS-PPаза), которая имеет дополнительную регуляторную часть, образованную парой CBS-доменов и DRTGG-доменом, в виде вставки в один из каталитических доменов (DHH) (рис. 1). Активный центр находится между DHH- и DHHA2-доменами. CBS-PPаза аллостерически активируется или ингибируется адениновыми моно- и динуклеотидами (AMP, ADP, ATP, диаденозинполифосфаты и др.). Эти лиганды связываются с CBS-доменами с наномолярной или микромолярной аффинностью, чаще всего кооперативно. Известно, что CBS-PPаза образует гомотетрамер, однако, его пространственная структура пока не поддается определению прямыми методами.



Рисунок 1. *Топология субъединицы CBS-PPазы.*

Используя подходы моделирования структуры (Modeller, последняя версия Alphafold2), молекулярной динамики, сайт-направленного мутагенеза и стационарной кинетики, мы получили модель структуры тетрамера CBS-PPазы, которая адекватно описывает эффекты регуляторных лигандов. Эта модель предполагает, что DHHA2-домен создает внутреннее напряжение, которое деформирует активный центр, при образовании тетрамера CBS-PPазы и поэтому является ключевым звеном в передаче сигнала из регуляторного центра в активный. Связывание регуляторных лигандов увеличивают или уменьшает это напряжение и деформацию активного центра, что изменяет активность CBS-PPазы. Сравнение полноразмерной CBS-PPазы и ее делеционного варианта без DHHA2-домена методами изотермической калориметрии, флуоресценции и молекулярной динамики подтвердило механизм регуляции фермента, предложенный на основании структурного анализа.

Нуклеотид-связывающие CBS-домены входят в состав многих белков, в том числе имеющих медицинскую значимость. Данные, полученные для CBS-PPазы, будет способствовать выяснению их регуляторных механизмов и возможных путей влияния на них. Кроме того, они открывают возможность применения CBS-доменов для направленного дизайна белков с регулируемой функцией.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 22-74-00031.

ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ МЕТАБОЛИТОВ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА, ПОЛУЧАЕМОГО БЕЗ ЭКСТРЕМАЛЬНОГО ОХЛАЖДЕНИЯ

Андреев Е.А., Карякин А.А.

МГУ имени М. В. Ломоносова, химический факультет
119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3
e-mail: andreev@analyt.chem.msu.ru

Конденсат выдыхаемого воздуха (КВВ) – это собираемая неинвазивно (т. е. без повреждения слизистых оболочек, кожных покровов, стенок кровеносных сосудов и пр.) жидкость, содержащая в себе множество неорганических соединений и биомаркеров (например, лактат, глюкоза [1]). Щадящий метод отбора и многокомпонентность поддерживает интерес к КВВ с точки зрения медицинской диагностики. Чаще всего конденсат отбирают при отрицательных температурах в сертифицированных приборах (ECoScreen, RTube и другие). При экстремальном охлаждении более, чем на 40°C, образец насыщается конденсатом водяных паров (относительная влажность выдоха может достигать 95%). В результате образцы КВВ претерпевают разбавление на 3 и более порядков величины [2], усложняя анализ образцов.

В настоящей работе был предложен метод сбора конденсата, основанный на конденсации капель аэрозоля в турбулентном потоке, не требуя принудительного охлаждения. Для реализации была спроектирована пластиковая ячейка, которую изготовили методом 3D-печати.

КВВ собирали у здоровых добровольцев в течение 10–30 минут в процессе прохождения выдоха через спроектированную ячейку. Анализ метаболитов (глюкоза, лактат) проводили при помощи высокоэффективных электрохимических биосенсоров на основе берлинской лазури. Содержание глюкозы в образцах варьируется в диапазоне от 20 до 150 мкМ, лактата – от 40 до 250 мкМ. Кроме того, была проведена оценка электролитного состава конденсата при помощи спектроскопии электрохимического импеданса.

Литература
1. A.A. Karyakin, S.V. Nikulina, D.V. Vokhmyanina, E.E. Karyakina, E.Kh. Anaev, A.G. Chuchalin *Electrochemistry Communications* 2017, **83**, 81-84.
2. J. Hunt. Exhaled Breath Condensate: *Immunology and allergy clinics of North America*, 2007, **27** 587–596.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, грант № 19–13–00131.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ В МРНК МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МРНК

Андреев Д.Е.

Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН
117997, Москва, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,
e-mail: cycloheximide@yandex.ru

Успешное применение вакцин на основе мРНК для профилактики новой коронавирусной инфекции открыло путь для создания принципиально новых лекарственных препаратов на основе мРНК. Выход белка с молекулы мРНК во многом определяется ее 5’ и 3’ нетранслируемыми областями (НТО), для мРНК млекопитающих с разными НТО эффективность трансляции может отличаться на несколько порядков. Недавно разработанные методы анализа белкового синтеза на полногеномном уровне, рибосомное профилирование и профилирование сканирующих рибосомных комплексов, позволяют обнаруживать и изучать новые цис-действующие элементы в НТО мРНК. Эти регуляторные элементы могут быть использованы для создания высокоэффективных терапевтических мРНК и мРНК с программируемыми свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, Соглашение № 075-15-2021-1049.

НОВЫЕ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ С УНИКАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Атрошенко Д.Л., Шеломов М.Д., Сергеев Е.П., Пометун А.А., Савин С.С., Тишков В.И.

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»», Химический факультет, Москва, Россия.
Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия.
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия.
119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3,
E-mail: atrdenis@gmail.com

Оксидазы D-аминокислот (DAAO) катализируют превращение D-аминокислот в соответствующие α-кетокислоты с образованием пероксида водорода и иона аммония. В основном выделяют два вида оксидаз D-аминокислот – это оксидазы с широким спектром субстратной специфичности и высокоспецифичные к D-аспартату.

Фермент выполняет важные физиологические функции в организме млекопитающих и находит широкое применение в биотехнологии. Наиболее важным применением DAAO является процесс получения 7-аминоцефалспорановой кислоты (7-АЦК) из цефалоспорина С. 7-АЦК затем используется для синтеза цефалоспориновых антибиотиков различных поколений. Сейчас все большее внимание уделяется DAAO для использования в качестве биосенсоров на D-аминокислоты. Уровень D-аминокислот является маркером развития различных заболеваний. Кроме того, уровень D-аминокислот является показателем степени ферментации и бактериального заражения продуктов питания.

Функции и роль DAAO в дрожжах до сих пор не изучены. При исследовании оксидаз D-аминокислот в геномах микроорганизмов находили не более 2-х генов DAAO. Нами при анализе генома дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 было обнаружено 6 генов, потенциально кодирующих DAAO. Эти гены были клонированы и экспрессированы в клетках *E. coli* - 5 в активной и растворимой форме и 1 как активные тельца включения. Растворимые ферменты были очищены и проведена их биохимическая характеризация. Изучено влияние температуры и pH на активности и стабильности ферментов, определены каталитические параметры с набором D-аминокислот, построены трехмерные модельные структуры и проведен их детальный анализ. Было показано, что новые DAAO отличаются по олигомерному составу и большинство из них имеет уникальные спектры субстратной специфичности, а также pH-профили активности и стабильности.

Гены DAAO характеризуются очень низкой гомологией, и их корректная аннотация в геномах является большой проблемой и часто выполняет неправильно. Нами на основе созданной базы «свойства-структура» был разработан биоинформационно-структурный подход для идентификации генов новых DAAO. Используя данный подход, можно с высокой вероятностью отличить кандидатные гены новых оксидаз D-аминокислот от генов других близкородственных ферментов (например, глициноксидазы), а также предсказать субстратную специфичность этих ферментов. Эффективность предложенного подхода была подтверждена на примере геномов экстремофильных бактерий и позволила впервые в мире найти ген DAAO в археях.

Работа выполнена в рамках Соглашения № 075-15-2021-1396 от 26.10.2021 а также в рамках выполнения государственного задания.

МЕМБРАННАЯ ПИРОФОСФАТАЗА – ПЕРВЫЙ ПЕРЕНОСЧИК H^+ И Na^+ НЕОКСИДОРЕДУКТАЗНОГО ТИПА С «ПРЯМЫМ» СОПРЯЖЕНИЕМ

Байков А.А., Анашкин В.А., Берцова Ю.В., Богачев А.В.

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленгоры
e-mail: baykov@belozersky.msu.ru

Транспорт ионов H+ и Na+ через мембрану обычно сопряжен с некоторой химической реакцией, которая поставляет энергию для создания градиента концентрации указанных ионов или использует его для катализа термодинамически невыгодной обратной реакции. Существуют два типа такого сопряжения — «прямое» и «непрямое» [1]. Первый тип характеризуется тем, что переносимая частица образуется непосредственно в сопряженной химической реакции, и такой частицей может быть только H+ или электрон. В этом случае каталитический центр и транспортный канал должны быть физически связаны. При «непрямом» сопряжении транспортируемая частица берется из среды и может быть самой разной природы. До недавнего времени считалось, что по механизму «прямого» сопряжения могут работать только переносчики электронов, а протон переносится только по механизму «непрямого» сопряжения. Широко известный пример «непрямого» сопряжения — «ротационный» механизм АТФ-синтазы [2].

Мембранная пирофосфатаза (мРРаза) является функциональным аналогом и эволюционным предшественником АТФ-синтазы. Оба фермента-переносчика сопрягают гидролиз/синтез полифосфата (АТФ или пирофосфата) с транспортом H+ или Na+, но мРРаза устроена гораздо проще (две одинаковые субъединицы с массой 66−90 кДа). Пересмотр литературных данных по кинетике переноса протонов и новые данные по быстрой кинетике гидролиза пирофосфата и ее зависимости от ионов Na+ привели к однозначному выводу, что мРРаза является первым переносчиком протона с «прямым» сопряжением. Транспортируемый протон образуется из нуклеофильной молекулы воды на стадии гидролиза и проходит через транспортный канал сам или выталкивает из него связанный ион натрия («вторичное сопряжение»).

Методом молекулярной динамики прослежены конформационные изменения в каталитическом цикле фермента. Как и в случае АТФ-синтазы, молекула мРРазы функционально асимметрична, но асимметрия достигается не за счет постоянного вращения одной части молекулы относительно другой, а за счет асинхронных изменений конформаций (колебаний) субъединиц. Эволюционно это более древнее и простое решение для промежуточной аккумуляции «химической» энергии для ее последующего использования в мембранном транспорте ионов. Анализ конформационных изменений субъединиц мРРазы в ходе каталитического цикла (в направлении гидролиза это связывание пирофосфата, его гидролиз в связанном виде и последовательное удаление двух молекул фосфата) подтверждает идентификацию сопрягающей стадии и детализирует молекулярный механизм работы энергетического аккумулятора в мРРаз. Обсуждаются также перспективы использования мРРазы для создания солеустойчивых растений и микроорганизмов.

Литература
1. Calisto F., Sousa F.M., Sena F.V., Refojo P.N., Pereira M.M. Chem. Rev. 2021, 121, 1804.
2. Boyer P.D. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, **37**, 2297; Walker J.E. ibid. p. 2309.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 23-24-00115.

АКТИВНОСТЬ ТРАНСАМИНАЗЫ ИЗ *HALISCOMENOBACTER HYDROSSIS* В РЕАКЦИЯХ С D-АМИНОКИСЛОТАМИ И (*R*)-АМИНАМИ: СТАБИЛИЗАЦИЯ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Бакунова А.К.,[а] Матюта И.О.,[а] Бойко К.М.,[а] Попов В.О.,[а,б] Безсуднова Е.Ю.[а]

[а] Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН 119071, Москва, Ленинский проспект, 33с2,
e-mail: albakunova@mail.ru
[б] Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1с12

Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые трансаминазы катализируют обратимый стереоселективный перенос аминогруппы с аминокислоты/амина на кетокислоту/кетон с образованием новой аминокислоты/амина и новой кетокислоты/кетона; на основе трансаминаз разрабатывают биокатализаторы стереоселективного аминирования органических соединений [1]. Создание биокатализатора невозможно без понимания взаимосвязи структуры и функции в природных трансаминазах. Объектом структурно-функциональных исследований стала трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis* (HalhyTA), которая отличается от канонической трансаминазы D-аминокислот из *Bacillus* sp, YM-1 строением активного центра [2].

Ранее мы показали, что HalhyTA активна с разнообразными D-аминокислотами, при этом активность с L-аминокислотами и первичными (*R*)-аминами не обнаружена. Удельная активность фермента в реакциях аминирования α-кетокислот достигала 200 U/mg, энантиомерный избыток продукта, D-аминокислоты, превышал 99% [2]. Цель данной работы состояла в поиске и характеристике структурных факторов и условий реакции, стабилизирующих холофермент и определяющих субстратную специфичность трансаминазы. Стабильность холофермента анализировали как в буфере, так и в операционных условиях. Были определены факторы диссоциации и стабилизации холофермента, подобраны оптимальные условия регенерации активной формы HalhyTA. Методом точечного мутагенеза проанализирована роль остатков активного центра в поддержании рабочей конформации кофактора PLP. Получен вариант HalhyTA_R90I, активный как в реакциях с D-аминокислотами, так и в реакциях с первичными (*R*)-аминами. По результатам анализа каталитической активности мутантных вариантов Halhy и кристаллической структуры комплекса HalhyTA_R90I с ингибитором фенилгидразином определены структурные факторы, определяющие эффективность связывания и превращения D-аминокислот и первичных (*R*)-аминов в активном центре HalhyTA_R90I.

Литература
1. Wu S., Snajdrova R., Moore J.C., Baldenius K., Bornscheuer U.T. Angew. Chemie - Int. Ed., 60 (2021) 88–119.
2. Bakunova A.K., Nikolaeva A.Y., Rakitina T.V., Isaikina T.Y., Khrenova M.G., Boyko K.M., Popov V.O., Bezsudnova E.Y., Molecules, 26 (2021) 5053.
3. Bakunova A.K., Isaikina T.Y., Popov V.O., Bezsudnova E.Y. Catalysts, 12 (2022) 1551.

Работа поддержана грантом РНФ № 19-14-00164.

УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА В ПОДДЕРЖАНИИ ПРОТЕОСТАЗА НОРМАЛЬНОГО И МУТАНТНОГО ХАНТИНГТИНА

Готманова Н.Н., Крячков В.А., Бачева А.В.

Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова

Полиглутаминовые заболевания, при которых происходит экспрессия мутантных белков с удлиненным полиглутаминовым фрагментом, это наследственные неизлечимые нейродегенеративные заболевания. Основной характеристикой таких заболеваний является избирательная гибель нейронов вследствие образования агрегатов плохорастворимых полиглутамин-содержащих мутантных белков. Болезнь Хантингтона – одно из таких заболеваний, решающим и фундаментальным генетическим фактором которой является патологическая мутация в гене HTT, кодирующем хантингтин (Htt), повсеместно экспрессируемый белок с массой около 350 кДа. Присутствие убиквитина в составе полиглутамин-содержащих агрегатов, как в посмертных образцах мозга, так и в модельных организмах *in vivo* сигнализирует об участии убиквитин-протеасомной системы в деградации mHtt [1,2]. Компоненты протеасомного комплекса (протеолитическое ядро 20S и регуляторная субъединица 19S) наряду с убиквитином и другими участниками системы протеостаза также обнаруживаются в составе цитоплазматических и внутриядерных агрегатов [3].

Нами обнаружено, что компоненты протеасомы совыделяются с хантингтином при использовании гель-хроматографии, и что добавление ингибиторов протеасомы к клеточным культурам при временной экспрессии хантингтина усиливает агрегацию мутантных полиглутамин-содержащих фрагментов и замедляет их протеолиз. Также нужно отметить изменение внутриклеточной каспазоподобной и трипсиноподобной активности протеасомы. Поскольку увеличение трипсиноподобной активности протеасомы обычно наблюдается в результате стрессовой реакции на истощение АТФ [4], аналогичный механизм может быть задействован и при экспрессии mHtt. Стимулирование активности протеасомы оказывало положительный эффект на гидролиз хантингтина при временной экспрессии в клетках HEK293T. Также нами выявлено, что низкомолекулярные субстраты, содержащие олигоглутаминовый фрагмент, довольно медленно гидролизуются протеасомой in vitro, а добавление 11S-регулятора увеличивает скорость гидролиза. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что убиквитин-протеасомная система непосредственно участвует в деградации mHtt, сдерживая его агрегацию; и активность протеасомы меняется при аккумуляции mHtt, что может способствовать общему дисбалансу протеостаза и прогрессированию нейродегенерации.

Литература
1. Paine S. et al. Neuroscience Letters. 2009. Vol. 460, № 3. P. 205–208.
2. Orth M. et al. Journal of Neurochemistry. 2003. Vol. 87, № 1. P. 1–6.
3.Riguet N. et al. Nat Commun. 2021. Vol. 12, № 1. P. 6579.
4. Schipper-Krom S., Juenemann K., Reits E.A.J. Biochemistry Research International. 2012. Vol. 2012. P. 1–12.

Работа выполнена в рамках госзадания (ЦИТИС №121031300037-7)

ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКА С МЕЛАНОМА-ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ (MIA) БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МИКРОАНАЛИЗОМ

Башмакова Е.Е., Кудрявцев А.Н., Франк Л.А.

Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок 50/50
e-mail: jeyn_a@bk.ru

Меланома кожи относится к одному из самых агрессивных типов рака. Своевременная диагностика данного заболевания – актуальная проблема современной клинической онкологии. Для меланомы в большей степени характерно развитие отдаленных метастазов чем местное рецидивирование. Одним из биомаркеров данного заболевания является белок с меланома-ингибирующей активностью MIA (Melanoma Inhibitory Activity protein). В настоящее время известно, что высокий уровень MIA связан с прогрессированием и метастазированием меланомы.

Существующие диагностические системы для определения уровня MIA в плазме или сыворотке крови основаны на взаимодействии антиген-антитело. Это импортные иммуноферментные наборы с колориметрической детекцией на основе анти-MIA антител, меченных пероксидазой хрена (диапазон определения MIA 0,78 – 50 нг/мл). Ни один из них не предназначен для клинического применения. Отечественных аналитических систем для определения уровня MIA в настоящее время нет.

Низкое пороговое значение MIA в сыворотке (6,5 – 9,4 нг/мл) обуславливает высокие требования к чувствительности анализа для его выявления.

Ранее нами было показано, что биолюминесцентный анализ на основе Ca^{2+}-регулируемого фотопротеина обелина обеспечивает высокую чувствительность, сопоставимую с таковой радиоизотопного анализа. Нами были созданы варианты генетических конструкций, кодирующих рекомбинантный белок MIA, его гибридный вариант MIA-обелин и получены высокоочищенные белки экспрессией в *E. coli*. В модельных анализах изучены свойства белков. На их основе предложен вариант анализа MIA конкурентного типа (Рис. 1).

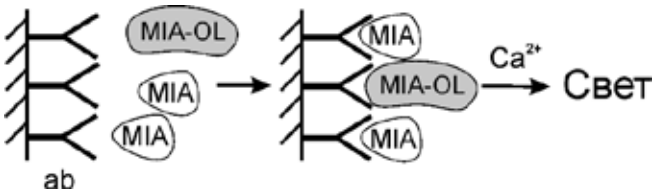


Рисунок 1. *Схема модельного конкурентного анализа MIA, ab – антитела к MIA*

Полученный биолюминесцентный сигнал обратно пропорционален концентрации рекомбинантного MIA от 2,5 нг/мл до 2500 нг/мл, что включает диагностически важный диапазон. Антитела, используемые в дизайне этого анализа, характеризуются низкой стабильностью, отсутствием на отечественном рынке, а также высокой стоимостью.

Перспективной альтернативой антителам являются аптамеры: высокоспецифичные аптамеры синтезируются химически, стабильны и легко могут подвергаться различным модификациям. С целью получения анти-MIA ДНК-аптамеров в рамках настоящего исследования был проведен их отбор из синтетической ДНК-библиотеки, получены кандидатные варианты аффинных последовательностей и проводится их исследование.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00090, https://rscf.ru/project/22-74-00090/

ГЕНЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В СТОЧНЫХ ВОДАХ ГОРОДА МОСКВЫ: РАЗНООБРАЗИЕ И МЕХАНИЗМЫ РАСПРОСТРАНЕНИЯ

Бегматов Ш.А.[a], **Дорофеев А.Г.**[b], **Пименов Н.В.**[b], **Марданов А.В.**[a], **Равин Н.В.**[a]

[a] *Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия*
[b] *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия*
e-mail: shabegmatov@gmail.com

Станции по очистке коммунальных сточных вод являются источниками как устойчивых к антибиотикам бактерий, так и генов резистентности к антибиотикам (резистом), которые попадают из них в окружающую среду. Очистные сооружения, в которые поступают сточные воды и микроорганизмы из различных источников, являются «горячими точками» для формирования штаммов с множественной резистентностью и их распространения. Московские станции по очистке коммунальных сточных вод, являющиеся одними из крупнейших в мире, ежедневно сбрасывают более 6 млн. куб. м очищенной воды в реку Москва, что составляет около половины ее стока. С учетом их масштаба, очистные сооружения Москвы могут быть крупным распространителем детерминант устойчивости к антибиотикам.

С целью изучения разнообразия и механизмов распространения генов антибиотикорезистентности нами был проведен метагеномный анализ образцов сточных вод (до и после очистки) и активных илов двух крупных очистных сооружений города Москвы.

Результаты анализа микробных сообществ по генам 16S рРНК показали, что относительная численность представителей филумов *Campylobacterota* и *Firmicutes* в ходе биологической очистки воды значительно уменьшается, в то время как доли протеобактерий, *Patescibacteria, Nitrospirota* и *Nanoarchaeota* в активных илах и очищенной воде увеличились.

Метагеномный анализ выявил присутствие сотен различных генов устойчивости во всех образцах. Относительное содержание генов антибиотико-резистентности в метагеноме активного ила и очищенной воды существенно ниже, чем в сточной воде до очистки. Гены устойчивости группы бета-лактамаз (в основном *blaOXA* и *bla*) в поступающей на очистку воде составили четверть (25.9%) всего резистома. В образцах активного ила и воды после очистки бета-лактамазы составляли почти половину резистома (40% в очищенной воде и 60% в активных илах). Большинство этих генов таксономически относятся к представителям *Proteobacteria.* Доля генов резистентности к макролидам и тетрациклинам в резистоме в ходе очистки воды значительно снижается (2-3 раза). Относительное содержание генов резистентности к аминогликозидам, сульфаниламидам, хлорамфениколу и рифамицину в воде до и после очистки и в активном иле существенно не отличалось.

Таким образом, хотя общее содержание генов резистентности к антибиотикам в микробиоме воды снижается в результате ее биологической очистки, в прошедшей очистку воде присутствуют гены резистентности к большинству классов антибиотиков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта 22-74-00022.

ВЗАИМОСВЯЗЬ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ В ТРАНСАМИНАЗАХ IV ТИПА PLP УКЛАДКИ (ОБЗОР ДОСТИЖЕНИЙ ЗА 10 ЛЕТ И НАКОПИВШИЕСЯ ВОПРОСЫ)

Безсуднова Е.Ю.[а], Бойко К.М.[а], Хренова М.Г.[а,б], Бакунова А.К.[а], Шилова С.А.[а], Матюта И.[а], Стеханова Т.Н.[а], Зейфман Ю.С.[в], Ракитина Т.В.[а,г], НиколаеваА.Ю.[в], Попов В.О.[а,б]

[а] Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук, Ленинский проспект 33, стр.2, 119071, Москва, Россия, eubez@inbi.ras.ru;
[б] МГУ им. М.В. Ломоносова;
[в] Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт";
[г] Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Трансаминазы [1] – природные биокатализаторы переноса аминогруппы – являются высоко стереоселективными ферментами. Широкая представленность в природе разнообразных по субстратной специфичности трансаминаз делает их привлекательными объектами как для биотехнологии, так и для фундаментальных исследований. Разнообразная субстратная специфичность достигается неодинаковым аминокислотным составом активных центров при высокой гомологии функциональных димеров и структурной упорядоченности активных центров. При всех достоинствах, обратимость реакции трансаминирования и специфичность преимущественно к альфа-амино/кетокислотам ограничивает применение трансаминаз в биотехнологии.

Мы поговорим о биоразнообразии трансаминаз IV типа PLP укладки, которые отличаются способностью катализировать редкое в природе (*R*)-селективное переаминирование. Стоит отметить, что трансаминазы IV типа PLP укладки включают как (*R*)-селективные трансаминазы D-аминокислот и первичных (*R*)-аминов, так и (*S*)-селективные трансаминазы природных разветвленных L-аминокислот, то есть IV тип укладки PLP-связывающего домена не накладывает ограничений на стереоселективность фермента. В археях и термофильных бактериях нами обнаружены трансаминазы с широкой субстратной специфичностью, активные как с гидрофобными ароматическими и алифатическими L-аминокислотами, так и с положительно заряженными L-аминокислотами и первичными (*R*)-аминами. Нами обнаружены трансаминазы D-аминокислот с организацией активного центра, отличной от канонических трансаминаз D-аминокислот. Недавние исследования позволили предложить путь сброса протона на стадии запуска процесса деаминирования D-аминокислоты. На сегодня путь сброса протона у трансаминаз IV типа PLP укладки является нерешенным, предложенный нами путь позволяет объяснить, почему при сходстве архитектуры активных центров одни трансаминазы активны как с D-аминокислотами, так и с первичными (*R*)-аминами, а другие только с D-аминокислотами. И, наконец, нами обнаружена трансаминаза – мономер. Кодирующий ген выделен из генома бактерии *Desulfobacula toluolica*, получена структура трансаминазы, ведется исследование её свойств.

Литература:
1.Браунштейн А.Е., Шемякин М.М. Биохимия, 1953, **18**, 393.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РНФ № 14-24-00172 и 19-14-00164, РФФИ № 18-04-00748.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ ДЛЯ БИОСЕНСОРОВ: РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ

Костюк А.И.[1,2], Раевский Р.И. [1], Иванова А.Д.[1], Котова Д.А.[1,2], Сергеева А.Д.[1,3], Храмова Ю.В.[3,1], Рапота Д.Д.[1,3], Катруха В.А.[1,3], Трифонова А.П.[1], Судоплатов М.А.[1,2], Чебаненко В.В.[3,1], Почечуев М.С.[3], Чеботарев А.С. [3,4], Ланин А.А.[3,4], Федотов И.В.[3,4], Федотов А.Б.[3,4], Браже Н.А.[3], Ezeriņa D. [5], Messens J. [5], Белоусов В.В.[1,2,6], Билан Д.С.[1,2]

[1]Институт биоорганической химии. им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, 117997, Москва, Миклухо-Маклая 16/10
[2]Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, 117997, Москва, Островитянова 1,
[3]Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Ленинские горы 1/62, Москва,
[4]Российский Квантовый Центр, 121205, Сколково, Москва, Большой бульвар 30/1
[5]VIB-VUB Center for Structural Biology, Vlaams Instituut voor Biotechnologie, B-1050, Brussels, Belgium,
[6]Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Федеральное медико-биологическое Агентство, 117997, Москва, Островитянова 1/10.
e-mail: d.s.bilan@gmail.com

Генетически кодируемые биосенсоры на основе флуоресцентных белков приобрели огромную популярность в медико-биологических исследованиях. Поскольку такие инструменты кодируются геном, их легко можно направлять в исследуемые модели любого уровня сложности: от внутриклеточных компартментов единичных клеток до тканей и органов трансгенных организмов. Появление некоторых биосенсоров позволило впервые визуализировать динамику ранее малоизученных биохимических процессов. Особенно это касается реакций с участием высоко реакционноспособных соединений с коротким временем жизни, как, например, активные формы кислорода, азота, галогенов. Классический биосенсор представляет собой химерную белковую молекулу, состоящую из сенсорного домена, который отвечает за взаимодействие с исследуемым параметром, и интегрированного в его структуру флуоресцентного белка, который визуализирует работу сенсорного домена. Таким образом, динамика флуоресцентного сигнала отражает динамику исследуемого параметра.

В качестве основы для разрабатываемых инструментов мы используем природные сенсорные домены бактериальных белков. Недавно в лаборатории был разработан ряд новых биосенсоров: Hypocrates для регистрации гипогалогенных кислот и их производных (на основе белка NemR из *E.coli*), PersIc для регистрации полисульфидов (на основе BigR из *X.fastidiosa*), Loci для регистрации ацил-КоА (на основе FadR из *V.cholerae*). Свойства данных биосенсоров мы детально охарактеризовали *in vitro* и в живых системах.

Главное преимущество генетически кодируемых биосенсоров заключается в их возможном применении в моделях *in vivo*. С использованием подхода оптоволоконного интерфейса в комбинации с различными биосенсорами нам удалось впервые визуализировать динамику некоторых биохимических параметров в тканях разных структур мозга крыс при развитии ишемического инсульта с первых секунд развития патологии. Еще одним популярным лабораторным объектом являются рыбы *Danio rerio*. В нашей лаборатории мы получили коллекцию рыб с экспрессией генов разных биосенсоров в самых различных тканях и органах. Мы применяем разрабатываемые нами биосенсоры в тканях *D.rerio* для исследования биохимических процессов при воспалительных реакциях и в условиях гипоксии.

При поддержке гранта РНФ 22-15-00299

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ГКР СПЕКТРОСКОПИИ И МЕТОДОВ ПАРАМЕТРИЗОВАННОЙ СТАТИСТИКИ

Богинская И.А.,[а] Сафиуллин Р.Р.,[а,б] Тихомирова В.Е.,[в] Крюкова О.В.,[в] Кост О.А.,[в] Афанасьев К.Н.,[а] Нечаева Н.Л.,[г] Булаева Н.И.,[д] Голухова Е.З.,[д] Рыжиков И.А.,[а,е] Курочкин И.Н.[в,г]

[а]ИТПЭ РАН, 125412, Москва, ул. Ижорская, 13, с.6, i.boginskaya@bk.ru
[б]МФТИ (НИУ), 141701, Московская обл., Долгопрудный, Институтский пер., 9
[в]МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1с3
[г]ИБХФ РАН 119334, Москва, ул. Косыгина, 4
[д]НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева, 121552, Москва, Рублевское шоссе, 135
[е]НОЦ ФМН - МГТУ им. Н.Э. Баумана,105082, Москва, Рубцовская наб, 2/18

Содержание в плазме крови человека ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), продуцированного кардиомиоцитами в тканях сердца, может указывать на развитие патологий сердечно-сосудистой системы и позволит оценить риски развития кардиальных осложнений[1]. Вследствие этого задача создания метода быстрой регистрации АПФ является актуальной. Для этого может быть использована спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), которая ранее показала себя перспективной в решении задач количественного и качественного определения биологических аналитов различной природы, в том числе белков, ферментов, вирусов и др.

Для проведения исследований были выделены и очищены до электрофоретически гомогенного состояния АПФ из разных тканей и жидкостей организма человека (сердца, легких и семенной жидкости). Источник АПФ определяет индивидуальный характер гликозилирования молекулы[2], что должно отражаться в колебательном спектре ферментов.

В результате измерений впервые были получены ГКР спектры АПФ из разных источников на планарных наноструктурированных тонких пленках серебра, ранее показавших себя эффективными для получения ГКР спектров высокомолекулярных аналитов[3]. Измерения были проведены с помощью спектрометра комбинационного рассеяния на основе конфокального микроскопа на длине волны возбуждения 785 нм. Для анализа полученного массива высокой размерности спектров трех видов АПФ была использована модель линейного дискриминантного анализа[4]. С помощью нее удалось получить представление спектра в пространстве более низкой размерности по сравнению с исходной. Показано, что спектры различных гликоформ АПФ в нем эффективно разделимы, что говорит о перспективности использования ГКР спектроскопии для дальнейших исследований по определению сердечного АПФ на фоне плазмы крови и АПФ из других источников. Далее с помощью свойства линейности классификатора была проведена оценка вкладов спектральных признаков в разделение различных видов АПФ и определены интервалы с их максимальными значениями. Выделенные интервалы соответствовали шести полосам колебаний: 833 (Tyr), 1605, 1241 (CH_2 wag.), 1169, (NH^{3+} def. в Leu(Trp-Leu)), 1473 (C_γ, C_δ def. в Lys) $см^{-1}$. Несоотнесенные полосы колебаний могут принадлежать непосредственно к гликановой составляющей ферментов.

Литература
[1] A. Goette et al., J. Am. Coll. Cardiol., 2000. **35**, 1669.
[2] О.А. Кост, Биоорганическая химия, 2018. **44**, 48.
[2] I. Boginskaya et al., J. Raman Spec., 2019, **9**, 3988.
[3] A. Barucci et. al., The Analyst, 2021, **146**, 674.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект 20-08-00632.

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ N-КОНЦЕВЫХ ZAD- И mBTB-ДОМЕНОВ АРХИТЕКТУРНЫХ БЕЛКОВ D.MELANOGASTER – УНИВЕРСАЛЬНЫХ ПЛАТФОРМ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Бойко К.М.,[а] Бончук А.Н.,[б] Бурцева А.Д.,[а,в] Моисеенко А.В.,[г] Николаева А.Ю.,[а] Балагуров К.И.,[б] Арков О.В.,[б] Георгиев П.Г.,[б] Попов В.О.[а]

[а] Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33с2, e-mail: kmb@inbi.ras.ru
[б] Институт Биологии Гена РАН
[в] Московский физико-технический институт (НИУ)
[г] Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Пространственная архитектура генома сложна, динамична и имеет ключевое значение для корректной регуляции генов. Нарушения в работе регуляторных систем генома, приводящие к сбоям в программе клеточной дифференцировки и пролиферации, являются причиной различных заболеваний человека. Установлено, что структурная организация хроматина контролируется особым классом белков, называемых архитектурными. Большинство таких белков имеют сложную мультидоменную организацию и их структурное исследование в полноразмерном виде крайне затруднено. В то же время представляет интерес изучение структур отдельных доменов архитектурных белков, в том числе обеспечивающих функцию белок-белкового взаимодействия. К числу последних относятся т.н. ZAD (zinc finger associated) и mBTB (Broad-complex, Tramtrack, and Bric-à-brac/poxvirus and zinc finger) домены.

ZAD-домены, широко распространенные у членистоногих, но обнаруженные также и животных (в т.ч у человека), присутствуют на N-конце многих белков, имеющих в своем составе цинковые пальцы типа C2H2, и формируют стабильные гомодимеры. Интересной особенностью данных доменов является крайне низкая степень гомологии по первичной последовательности – в среднем порядка 20%. Несмотря на большой объем молекулярно-биологических данных о ZAD-доменах, структурные данные крайне немногочислены – так ранее была установлена лишь одна структура представителя ZAD-доменов из белка Grauzone, что оставляло открытым вопрос о консервативности пространственной укладки таких белков и механизмах димеризации.

BTB-домены широко распространены у эукариотических белков, выполняющих различные функции. Большинство таких белков могут формировать мультимеры различного порядка (напр. димеры или гексамеры), а также взаимодействовать с другими белками. Несмотря на наличие общей пространственной укладки BTB-доменов, добавление к ней элементов вторичной структуры приводит к изменению интерфейсов мультимеризации и, соответственно, к появлению новых стабильных олигомерных форм. В этой связи интерес представляет структурное изучение различных мультимерных форм BTB-доменов и, в частности, гексамерных mBTB-доменов, структура которых к настоящему моменту не установлена.

В настоящей работе с применением методов интегративной структурной биологии проведено исследование структурных особенностей ZAD- и гексамерных mBTB-доменов архитектурных белков *D.melanogaster*.

Работа выполнена при поддержке Министерства Науки и Высшего Образования Российской Федерации - грант № 075-15-2021-1354.

G-КВАДРУПЛЕКСЫ – “КАТАЛИЗАТОРЫ” ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ

Павлова Ю.И., Юдин М.С., Варижук А.М.

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Малая Пироговская 1а, 119435, annavarizhuk@gmail.com

Концепция разделения фаз “жидкость-жидкость” (LLPS) в растворах биополимеров позволила объяснить формирование немембранных внутриклеточных органелл, таких как ядрышки, спеклы и др. Все они являются конденсатами белков и РНК/ДНК, образуются спонтанно при достижении пороговой концентрации одного из компонентов и удерживаются за счет слабых транзиентных взаимодействий. Принципиальное отличие конденсатов от твердых агрегатов состоит в сохранении диффузии при высокой локальной концентрации компонентов. Это открывает возможности ускорения биохимических реакций в определенном клеточном компартменте. В терминах LLPS все чаще описывают, в частности, активацию транскрипции. Формирование конденсатов транскрипционных факторов (TF) наблюдается, прежде всего, в участках множественных сайтов связывания TF и контактов ДНК-ДНК, т.е. при суперэнхансерах (SE). Скаффолдами конденсатов выступают белки с неструктурированными участками (IDR). Нуклеиновым кислотам отводится пассивная роль в большинстве немембранных органелл, однако SE-ДНК концентрируют IDR-содержащие TF и удерживают их за счет специфических ДНК-белковых взаимодействий. В данной работе рассмотрена еще одна особенность SE – обогащение мотивами гуаниновых квадруплексов (G4), которые не только привлекают/удерживают TF, но и способствуют их выделению в отдельную фазу.

Формирование G4 не предполагает высокоаффинного связывания с факторами транскрипции, но повышает вероятность слабых транзиентных контактов благодаря доступности ароматической системы (гуаниновой тетрады) для взаимодействий типа “катион-pi”, “pi-pi”. Именно такие взаимодействия преобладают в большинстве немембранных органелл. В то время как B-форма ДНК открыта лишь для электростатических взаимодействий с положительно заряженными участками TF или гистонов, G4-фолдинг переводит ДНК в категорию более универсальных мультивалентных полимеров. Для проверки этой гипотезы были проанализированы последовательности SE нескольких клеточных линий и соответствующие данные иммунопреципитации хроматина с антителами к TF. Выделены типичные для SE G4 и подтверждена их ассоциация с IDR-содержащими TF. На примере характерного IDR-TF BRD4 проанализировано взаимодействие с G4 в бесклеточной системе. Установлено, что белок эффективно формирует конденсаты в присутствии G4-ДНК, но не B-ДНК, хотя его бромодомен проявляет лишь умеренное сродство к G4, сопоставимое с таковым к ацетилированным гистонам. Полученные данные подтверждают предположение о том, что именно G4 “катализируют” фазовый переход BRD4 и его белков-партнеров за счет транзиентных взаимодействий. Эти результаты дополняют представления о механизмах активации транскрипции и указывают на возможность репрограммирования генной экспрессии в опухоли за счет действия на G4 в опухоль-специфичных SE.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-15-00129.

ПЕРЕСТРОЕНИЕ ТРЕХЪЯДЕРНОГО МЕДНОГО ЦЕНТРА ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ПРОЦЕССЕ КАТАЛИЗА

Варфоломеева Л.А.,[а] Поляков К.М.,[б] Соловьева А.Ю.,[а] Шипков Н.С.,[а] Дергоусова Н.И.,[а] Бойко К.М.,[а] Тихонова Т.В.,[а] Попов В.О.[а]

[а]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2
e-mail: larisaavarfolomeeva@gmail.com
[б]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской Академии Наук, 119991, Москва, улица Вавилова, 32

Медь принимает участие в качестве кофактора в широком спектре окислительно-восстановительных процессов, протекающих в живых организмах. Медь-содержащие ферменты катализируют реакции окисления и восстановления различного рода субстратов, начиная от высокомолекулярных полисахаридов, ароматических вторичных метаболитов и полипептидов и заканчивая низкомолекулярными N_2O, кислородом и суперкосид-анион радикалом [1]. Классификация медных центров ферментов основана на строении координационной сферы ионов меди [2]. В ходе каталитического цикла ионы меди в активном центре ферментов изменяют степень окисления, что сопровождается перестроением координационной сферы. Показано, что трехъядерный медный центр фермента нового класса - тиоцианатдегидрогеназы (TcDH), впервые охарактеризованного у галоакалофильной бактерии *Thioalakalivibrio paradoxus* [3], претерпевает значительные изменения при связывании субстрата и в процессе катализа. Рентгеноструктурные данные атомного разрешения (1.05 Å) позволили точно охарактеризовать координационную сферу ионов меди активного центра TcDH в открытой и закрытой конформации фермента. На основании структуры комплекса фермента с ингибитором - тиомочевиной была предположена ориентация субстрата (тиоцианата) в активном центре TcDH. Атом серы тиоцианата образует две координационные связи с парой ионов меди Cu2 и Cu3, атом азота – одну координационную связь с ионом меди Cu1. Связывание субстрата в активном центре TcDH приводит к закрытию субстратного канала подвижной петлей и перестройке медного центра – изменяются конформации аминокислотных остатков и координационная сфера ионов меди. Координационная сфера иона меди Cu2 подвергается наибольшим изменениям. Ион меди Cu2 смещается почти на 2 Å при разрыве координационной связи с остатком лизина K67 и образовании новой с атомом серы тиоцианата. Смещение иона меди Cu2 является, вероятно, ключевым этапом в связывании субстрата и каталитической реакции. Так, точечная замена лизина K67 на глутамин, неспособный образовывать координационную связь с ионом меди, приводила к полной потере ферментативной активности. Полученные структурные данные проливают свет на детали механизма действия TcDH.

Литература
1. Solomon E.I. *Chemical Reviews*, 2014, **114**, 3659−3853.
2. Rubino J.T., Franz K.J. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012, **107**, 129-143.
3.Tikhonova, T.V., Sorokin, D.Y., Hagen, W.R., Khrenova, M.G., Muyzer, G., Rakitina, T.V., Shabalin, I.G., Trofimov, A.A., Tsallagov, S.I., Popov, V.O. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, **117**, 5280-5290.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 23-74-30004.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДА ДЛЯ АНАЛИЗА ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Васильева А.Д.,[а] Богинская И.А.,[б] Юрина Л.В.,[а] Шкляев А.В.,[в] Хорец Д.А.,[в] Евтушенко Е.Г.,[а,г] Курочкин И.И.,[д] Кононихин А.С.,[а] Розенфельд М.А.,[а] Рыжиков И.А.,[б] Курочкин И.Н.[а,г]

[а]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук, 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4,
e-mail: ms.kadaver@mail.ru
[б]Институт теоретической и прикладной электродинамики Российской Академии наук, 125412, г. Москва, ул. Ижорская, д. 13, стр. 6
[в]Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Механико-математический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 1
[г]Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3
[д]Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича, 127051, г. Москва, Большой Каретный переулок, д.19 стр. 1.

Посттрансляционные модификации (ПТМ) белков участвуют во многих биологических процессах. Считается, что аберрантные ПТМ указывают на участие белков в механизмах развития заболеваний. По этой причине ПТМ белков выделяются в качестве многообещающего инструмента молекулярной диагностики.

Единственным на данный момент методом, способным выполнять многосторонний анализ ПТМ белков, является тандемная масс-спектрометрия (МС/МС). При всех преимуществах метода и его активном развитии в последние годы, существует ряд нерешенных проблем, которые до сих пор не позволяют применять его в рутинной клинико-лабораторной практике для анализа белковых маркеров, в т.ч. ПТМ.

Спектроскопия комбинационного рассеяния может обеспечить альтернативный и дополнительный подход, имеющий высокую чувствительность и пропускную способность, с возможностью полной автоматизации процессов, а значит, отвечающий большинству требований к методам молекулярной диагностики, использующихся в клинико-лабораторной практике. Для улучшения чувствительности метода используют подходы, основанные на эффекте гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). ГКР наблюдается для молекул вблизи или на поверхности металлических наноструктур, реализующих эффект поверхностного плазмонного резонанса. Однако, расположение белковых молекул у поверхности наноструктур не позволяет создать достаточную для обнаружения ГКР сигнала плотность молекулярного слоя. Данная проблема затрудняет исследование методом ГКР молекул белка. Для решения задачи создания высокочувствительного метода для определения уровней ПТМ белков на основе ГКР был использован подход, основанный на предварительном ферментативном гидролизе исследуемых белков с последующим анализом пептидной смеси. В рамках работы был исследован один из основных белков системы гемостаза – фибриноген, окислительные ПТМ которого ассоциированы с развитием ряда заболеваний и могут иметь диагностическую значимость, в том числе, на ранних стадиях патогенеза.

Приведенные результаты получены в рамках бюджетного финансирования по теме 122041400080-0. В работе использовали оборудование, приобретенное по Программе развития МГУ.

БЕЗРЕАГЕНТНЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Куроптева А.Е., Скрипец Ю.А., Вятчанина Э.А., Смирнов Е.А., Шеховцова Т.Н., Веселова И.А.

МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии, Ленинские горы, 1-3, ГСП-2, Москва, 119991, Россия,
e-mail: irina.veselova@mail.ru

Одним из перспективных направлений современной биоаналитической химии является разработка безреагентных (не требующих добавления реагентов извне за исключением аналита) оптических сенсоров на основе ферментов.

Примером такого фермента служит пероксидазы из корней хрена и ключевым недостатком/ограничением сенсоров с ее участием является необходимость добавления ряда реагентов в ходе выполнения анализа. И если проблема включения вторых субстратов пероксидазы в различные твердые матрицы (основы сенсорного слоя) является более проработанной, то различные способы стабилизации основного субстрата (пероксида водорода) не дали существенных результатов.

В рамках настоящей работы предложен способ *in situ* генерации пероксида водорода «по требованию» из наночастиц ZnO_2 путем регулирования pH буферным раствором. Благодаря этому подходу исключается необходимость добавления основного субстрата извне, что позволяет перейти к безреагентным оптическим сенсорам с участием указанного фермента.

На основе этого подхода разработаны оптические сенсоры на основе пероксидазы, хромогенных *(3,3',5,5'*-тетраметилбензидина и *2,2'*-азино-бис(*3*-этилбензотиазолин-*6*-сульфокислота) и флуорогенного (*о*-фенилендиамина) субстратов-восстановителей и наночастиц ZnO_2, включенные в полимерные матрицы природных полимеров как основы чувствительного слоя.

Перспективность применения предложенных сенсорных систем продемонстрирована в определении активности пероксидазы в интервале 90-485 ед./мг, а также витаминов группы Р (эпикатехина, кверцетина) и витамина B_1 (тиамина) на уровне микромолярных и наномолярных концентраций соответственно.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (№ 23-13-00276).

АПТАМЕРЫ К БИОМАРКЕРАМ СПОНДИЛОАРТРИТОВ КАК ОСНОВА ДЛЯ НОВЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ И ТАРГЕТНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Воробьева М.А. [а], **Давыдова А.С.** [а,б], **Шатунова Е.А.** [а], **Курочкина Ю.Д.** [а,б], **Королев М.А.** [а,б]

[а]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8, e-mail: maria@vorobjeva.ru

[б]Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии - филиал ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН, 630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, д.2

ДНК- и РНК-аптамеры – класс функциональных нуклеиновых кислот, способных узнавать выбранные молекулярные мишени благодаря сочетанию уникальной нуклеотидной последовательности и пространственной структуры. Высокая аффинность и специфичность связывания позволяет рассматривать их в качестве биоузнающих элементов для создания систем детекции, а также в роли адресных ингибиторов функциональной активности молекул-мишеней. Именно поэтому с точки зрения биомедицинского применения аптамеры представляют собой наиболее реальную альтернативу моноклональным антителам. Выгодными преимуществами аптамеров являются гибкая адаптация протоколов их селекции к конкретной мишени и поставленной задаче, возможность масштабируемого и воспроизводимого химического синтеза и введения широкого спектра дополнительных модификаций, нетребовательность к условиям транспортировки и хранения.

С нашей точки зрения, одним из наиболее интересных и перспективных направлений биомедицинского применения аптамеров является создание тест-систем и потенциальных таргетных ингибиторов, направленных на растворимые регуляторные белки – участники воспалительных каскадов. В этом плане особое внимание привлекает возможность использования аптамеров для разработки новых подходов к диагностике и терапии иммуновоспалительных ревматических заболеваний. Частая встречаемость этих заболеваний, их хронический характер, а также необходимость ранней диагностики требуют создания новых диагностических тест-систем, обеспечивающих долговременный мониторинг ряда биомаркеров. Кроме того, современные стратегии лечения ревматических заболеваний в высокой степени ориентированы на таргетное воздействие, и задачи создания эффективных и доступных препаратов такого типа до сих пор полностью не решены.

В нашем исследовании разрабатывается комплексный подход к разработке новых способов диагностики и терапии анкилозирующего спондилита (АС) с использованием ДНК- и РНК-аптамеров, направленных на биомаркеры – ключевые участники его патогенеза: провоспалительные цитокины фактор некроза опухоли α и интерлейкин-17А, а также ингибитор Wnt-сигнального пути белок Dickkopf-1. В докладе будут представлены результаты создания аптамерных колориметрических тест-систем в микропланшетном формате, аналогичном иммуноферментному анализу, и исследования возможности их использования для детекции выбранных биомаркеров, в том числе в образцах сыворотки крови от пациентов с АС и здоровых доноров.

Работа поддержана совместным грантом РНФ и Правительства Новосибирской области № 22-15-20050.

ПЕЧАТНЫЕ ОБЪЕМНО-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ КАК ОСНОВА БИОСЕНСОРОВ

Вохмянина Д.В., **Карякин А.А.**

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы 1с3,
e-mail: vokhmyanina@gmail.com

Берлинская лазурь (БЛ) известна как лучший электрокатализатор восстановления пероксида водорода. Каталитически синтезированные наночастицы БЛ [1] также известны как искусственные ферменты-пероксидазы – так называемые «нанозимы». В данной работе для объемной модификации рабочего электрода использовались наночастицы БЛ со средним размером 35 нм. Использование объемно-модифицированных электродов приводит к значительному сокращению временных и трудовых затрат за счет упрощения массового производства. Соответственно, время изготовления одного датчика может быть сокращено с более чем полутора часов до нескольких минут.

Изготовленные с помощью трафаретной печати с использованием углеродной пасты, содержащей каталитически синтезированные наночастицы БЛ, сенсоры для определения H_2O_2,. несмотря на более низкую чувствительность, показали как более широкий линейный диапазон определяемых концентраций (5×10^{-7}–1×10^{-3} М), так и примерно в четыре раза меньший предел обнаружения по сравнению с сенсорами с модифицированной БЛ поверхностью из-за значительного снижения шума, в результате чего отношение сигнал/шум в среднем в шесть раз выше (рис. 1). Соответствующие биосенсоры для определения глюкозы и лактата продемонстрировали аналогичную с биосенсорами на основе электродов с модифицированной поверхностью чувствительность [2]. Применимость разработанных биосенсоров для анализа сыворотки крови человека была показана на стандартных образцах. Ожидается, что сокращение времени и затрат на производство объемно-модифицированных электродов, а также их аналитические характеристики, которые имеют преимущества перед обычными поверхностно-модифицированными датчиками, позволят широко использовать их в (био)сенсорике.

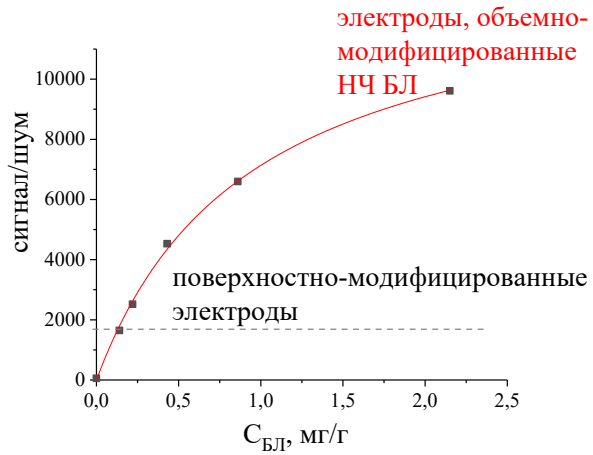


Рисунок 1. *Зависимость соотношения сигнал/шум от содержания наночастиц Берлинской лазури в углеродной пасте.*

Литература
1. Komkova M.A., Karyakina E.E., Karyakin, A.A. *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 11302.
2. Vokhmyanina D.V., Daboss E.V., Sharapova O.E., Mogilnikova M.A., Karyakin A.A. *Biosensors,* 2023, **13**, 250.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-13-00131, https://rscf.ru/project/19-13-00131/.

АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ РАЦИОНАЛЬНО СКОНСТРУИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ БЕЛКА CAS9 ИЗ *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Вохтанцев И.П.,[а,б] **Кадцын Е.Д.,** [б,в] **Аманова М.М.,** [а,б] **Бакулина А.Ю.,** [г] **Жарков Д.О.** [а,б]

[а] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8*
[б] *Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1*
e-mail: ivanvohtancev@gmail.com
[в] *Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, 630090, Новосибирск, ул. Институтская, 3*
[г] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово*

В последнее десятилетие метод рационального дизайна широко использовался для улучшения инструментов редактирования генома на основе белка Cas9 из *Streptococcus pyogenes* [1-3]. Подход заключался в анализе рентгеноструктурных данных и создание замен аминокислот, участвующих в стабилизации неадресуемой цепи ДНК или дестабилизации гетеродуплекса sgРНК/ДНК, чтобы повысить специфичность системы CRISPR/Cas9. В данной работе использовались методы молекулярной динамики и химической кинетики для того, чтобы прояснить термодинамические и кинетические аспекты активности и специфичности CRISPR/Cas9.

Посредством молекулярно-динамического анализа были идентифицированы аминокислоты, оказывающие наибольший вклад во взаимодействие с sgРНК/ДНК. Для дальнейшего аланинового скрининга были выбраны аминокислоты (K163, F164, R403, K918) с различной энергией взаимодействия.

Кинетические исследования показали, что нет существенных изменений в наблюдаемых константах скорости реакции для белков дикого типа (WT) и мутантов при расщеплении дуплексных субстратов без мисматча. Однако для всех субстратов с одним мисматчем (4, 9, 14, 18 п.н. от PAM) наблюдалось снижение активности расщепления белком дикого типа. Профили специфичности белка дикого типа и мутантов K163A, F164A незначительно отличались друг от друга. Мутант R403A был более специфичным, а K918A был менее специфичен относительно белка дикого типа.

Полученных данные свидетельствуют о том, что полная энергия белка и термодинамический вклад отдельных аминокислот не коррелируют с кинетикой.

Для того, чтобы выявить основы термодинамической специфичности Cas9 было проведено моделирование гетеродуплекса с мисматчем в положение 14 п.н. от PAM для мутанта R403A и белка дикого типа, а также создана библиотека всех сочетаний исследуемых замен для редактирования гена *rpoB E. coli*.

Литература
1. Kleinstiver B.P. et al. *Nature*, 2016, **529**, 490-495.
2. Slaymaker I.M. et al. *Science*, 2016, **351**, 84-88.
3. Chen J.S. et al. *Nature*, 2017, **550**, 407-410.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 21-74-10104.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМИНОГЕНА

Гаврилина Е.С.[а], Васильева А.Д.[а], Юрина Л.В.[а], Иванов В.С.[а], Индейкина М.И.[б], Бугрова А.Е.[а], Кононихин А.С.[в], Николаев Е.Н.[в], Розенфельд М.А.[а]

[а] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, 119334, ул. Косыгина, д. 4, e-mail: e.gavrilina98@gmail.com

[б] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9,

[в] Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Сколковский институт науки и технологий», 121205, г. Москва, территория инновационного центра «Сколково», Большой бульвар, д. 30, стр.1

Белки являются восприимчивыми мишенями к действию активных форм кислорода (АФК). Имеются убедительные доказательства того, что модифицированные при окислении белки накапливаются в организме при старении и различных заболеваниях, ассоциированных с окислительным стрессом. По этой причине связь между окислительными посттрансляционными модификациями (ПТМ) и структурно-функциональными нарушениями белков находится в центре внимания многих исследований.

Плазминоген является проферментом плазмина, фермента, который играет фундаментальную роль в некоторых физиологических и патологических процессах, включая растворение сгустков фибрина, ремоделирование тканей и заживление ран, развитие сердечно-сосудистых заболеваний, воспаление и миграция опухолевых клеток.

В работе впервые изучено влияние индуцированного окисления Glu-плазминогена на повреждение его первичной структуры и биологическую активность плазмина.

Обобщенные результаты, полученные с помощью тандемной масс-спектрометрии (МС/МС), электрофореза и колориметрии продемонстрировали, что ни один из модифицированных аминокислотных остатков, обнаруженных в проферменте, обработанном 25 мкМ гипохлорита (HOCl/OCl-) или 100 мкМ перекиси водорода (H_2O_2), не оказывал влияния на активность образованного их этих образцов плазмина. Однако обработка плазминогена повышенными концентрациями HOCl/OCl- от 25 мкМ до 100 мкМ или H2O2 от 100 мкМ до 300 мкМ способствовала частичной потере активности фермента.

Предполагается, что несколько остатков метионина (Met 57, Met 182, Met 385, Met 404, Met 585 и Met 788), локализованных в различных белковых доменах, служат ловушками АФК, обеспечивая тем самым эффективный механизм защиты плазминогена в условиях окислительного стресса. Установлено, что окисление Trp 235, Trp 417, Trp 427, Trp 761 и Tyr 672 приводит к снижению биологической активности плазмина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 21-74-00146, и бюджетного финансирования по Государственному заданию (тема 0084–2014–0001, № гос. регистрации 01201253311). В работе использовали оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

ПРЕИМУЩЕСТВА СОЧЕТАНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ И АНТИГИПОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЕЙ В ОДНОЙ МОЛЕКУЛЕ

Хушпульян Д.М.[1], Полозников А.А.[1], Захарянц А.А.[1], Чубарь Т.А.[2], Газарян И.Г.[2], Никулин С.В.[1]

[1]Факультет биологии и биотехнологии, ВШЭ, Москва
[2]Кафедра химической энзимологии Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия igazaryan@gmail.com

Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF), активирует генетическую программу выживания клетки при гипоксии. Стабильность HIF регулируется гидроксилированием, катализируемым HIF пролилгидроксилазой. Ингибиторы фермента – роксадустат, вададустат, энародустат – получили разрешение на использование для лечения почечной недостаточности в Китае и Японии. Ишемические повреждения при инсульте и нейродегенеративных заболеваниях характеризуются в том числе и интенсивным окислительным стрессом, ведущим к некрозу и ферроптозу. Антиоксидантная генетическая программа запускается транскрипционным фактором Nrf2, чья стабильность, аналогично HIF, также регулируется протеасомной деградацией. Мишени Nrf2 включают защитную систему на основе глутатиона, и в частности глутатионпероксидазу, а также белок-супрессор ферроптоза 1 (FSP1, ранее известный как митохондриальный фактор, индуцирующий апоптоз AIFm), катализирующий восстановление радикалов убихинона с помощью NADH. Сочетание в одной молекуле антигипоксической и антиоксидантной активностей позволячет клетке выживать в реальных условиях ишемии-реперфузии. Разрабатываемые новые препараты двойного действия были изучены методом сравнительного транскриптомного анализа с известными активаторами HIF и Nrf2, а именно роксадустатом и диметилфумаратом (известным как препарат Tecfidera™, для рассеянного склероза). Любопытно, что роксадустат на самом деле имеет слабовыраженную антиоксидантную активность, наблюдаемую в репортерном анализе (Neh2-luciferase assay). Апробация новых препаратов в модели гипоксии на нейронах показывает их преимущества по сравнению с ранее разработанными ингибиторами HIF пролилгидроксилазы, не обладающими побочной антиоксидантной активностью, подтверждая тем самым необходимость такой дополнительной активности.

Работа проводится при поддержке Российского Научного Фонда (проект 20-15-00207).

ИНИЦИИРОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКОГО ОТКЛИКА КЛЕТКИ С ПОМОЩЬЮ СИЛОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА МАТРИЦУ ПОСРЕДСТВОМ ВВЕДЕННЫХ В НЕЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ: АНАЛИЗ МЕХАНИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ

Головин Д.Ю.[а], Головин Ю.И.[аб], Клячко Н.Л.[б]

[а] Тамбовский Государственный Университет им. Г.Р. Державина, 192000, Тамбов, ул. Интернациональная 33, e-mail: nano@tsutmb.ru
[б] Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1-11Б

В работе обсуждается способ удаленного магнитомеханического стимулирования биоактивных молекул и клеток, иммобилизованных на магнитосенсибилизированной полимерной матрице. Одной из ключевых задач при выборе метода такого стимулирования является оценка реально достижимых сил, прикладываемых к молекуле или клетке со стороны матрицы при воздействии магнитным полем (МП) на магнитные наночастицы (МНЧ), закрепленные на волокнах матрицы. Это необходимо для оптимального выбора параметров МП и МНЧ, структуры и механических свойств матрицы, формулировке требований к размещению и подготовке МНЧ в матрице. Огромное количество возможных вариантов организации такого управления, в частности, мелкие или крупные МНЧ, магнитомягкие они или магнитожесткие, втягивание их в неоднородном поле или поворот в однородном, существенно различающиеся диаметр, продольная и изгибная жесткость волокон матрицы, условия в точках крепления волокон друг к другу требуют проведения множества оценок максимальных сил и деформаций, принципиально достижимых в различных условиях. Взаимодействия матрицы с целевыми клетками, подложкой, клеток со средой, друг с другом и подложкой дополнительно усложняют картину и не входят в рассматриваемые на данном этапе модели.

Разработанные модели и проведенные оценки показали, что:

1. во всех вариантах продольная жесткость волокон столь велика, что их продольные деформации пренебрежимо малы в любом лабораторном МП, так что растяжение волокон не способно вызывать какие-либо биохимические отклики;
2. поперечная изгибная жесткость волокон мала и не является лимитирующим фактором, следовательно, изгибные деформации отдельных волокон матрицы могут быть использованы для магнитомеханической активации взаимодействующих с ними клеток;
3. мелкие МНЧ (10-50 нм) в концентрациях, не приводящих к их агрегированию, могут создавать силы плотностью не более десятков пН на миллиметр волокна, чего, вероятно, недостаточно для вызова заметных биохимических откликов;
4. крупные магнитомягкие МНЧ (диаметром несколько микрометров) способны в реализуемом неоднородном поле вызывать силы с плотностью порядка нН на миллиметр, т.е. десятков пН на клетку, чего достаточно для инициирования биохимического отклика;
5. вариант с поворотом магнитожестких МНЧ в однородном поле в принципе возможен и может вызывать силы порядка сотен пН, однако его реализация на практике заметно сложнее предыдущего по многим причинам.

Таким образом, с точки зрения механического воздействия на клетки, оптимальным является использование крупных магнитомягких МНЧ с размером близким к диаметру волокна в максимально достижимой линейной плотности на волокне. При диаметре МНЧ магнетита и волокна 10 мкм и среднем расстоянии между МНЧ на волокне 100 мкм плотность силы может достигать тысяч пН/мм, чего достаточно для активации ответа нескольких клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 22-13-00261.

МЕХАНИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ФЕРМЕНТОВ И ДРУГИХ БИОСИСТЕМ ПЕРЕМЕННЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ

Головин Ю.И.[аб], Головин Д.Ю.[б], Клячко Н.Л.[а]

[а] Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1-11Б,
e-mail: yugolovin@yandex.ru
[б] Тамбовский Государственный Университет им. Г.Р. Державина,
192000, Тамбов, ул. Интернациональная 33

Переменные магнитные поля (ПМП) различной пространственно-временной структуры, как инструмент дистанционного управления биохимическими системами, имеют множество достоинств. Они легко генерируются и от герцовых до гигагерцовых частот беспрепятственно проникают в любые ткани на большую глубину, не создавая заметной радиационной нагрузки на организм. Существует множество экспериментальных работ, доказывающих существование магнитных эффектов на биообъекты во всем спектре их иерархии – от макромолекул ферментов до живых организмов. Однако элементарные мишени такого действия, физические механизмы первичных актов и экспериментально наблюдаемых эффектов остаются в большинстве случаев не вполне ясными. Исключение составляют ПМП мегагерцового и гегагерцового диапазона частот, которые вследствие потерь энергии поля разной природы создают нагрев тканей, перекрывающий на много порядков величины все эффекты от собственно магнитного поля. Другой физически ясный канал воздействия ПМП на биосистему возникает при наличии в ней магнитных наночастиц (МНЧ) естественного (например, ферритин) или искусственного происхождения (например, специально введенные частицы магнетита).

В докладе обсуждается последний случай. Рассматриваются несколько вариантов использования МНЧ магнетита как первичной мишени и медиатора действия поля. Радиочастотное ПМП (0.1-1 МГц) вызывает разогрев МНЧ и окружающей их среды, что обычно называют магнитной гипертермией. ПМП лабораторной напряженности с частотами <1 кГц являются негреющими даже при наличии МНЧ. Последние могут оказывать только механически-деформационное воздействие на окружающие макромолекулы, поскольку совершают в однородном ПМП вращательно-колебательное движение, а в неоднородном, в дополнение к этому, - еще и возвратно поступательное. При этом МНЧ могут находиться в свободном состоянии в суспензии и действовать на окружающие макромолекулы гидродинамически, а могут быть конъюгированы с намеченными молекулами, везикулами, клетками. Разработанные модели и расчеты по ним показывают, что заякоренные МНЧ могут воздействовать на субстрат с силами на 2 порядка превышающими гидродинамические. Наконец, МНЧ могут быть импрегнированы в высокопористые полимерные матрицы – носители биоактивных молекул или клеточных культур. В этом случае благодаря явлению механотрансдукции можно будет наблюдать различные биохимические отклики и механоиндуцированные эффекты изменения метаболизма клеток. Более подробно поведение магнитоуправляемых матриц рассмотрено в отдельном докладе.

Работа частично выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 22-13-00261. Экспериментальные примеры, данные в докладе, выполнены на оборудовании, купленном, в том числе, с помощью Программы развития МГУ.

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК В ПРИСУТСТВИИ ФЕРМЕНТОВ И АКЦЕПТОРОВ: ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ В АНАЛИЗЕ

Горячева И.Ю., **Дрозд Д.Д.**,

Саратовский Государственный Университет, Астраханская 83, 410012, Саратов
e-mail: goryachevaiy@mail.ru

Люминесцентные полупроводниковые квантовые точки (КТ) это достаточно новый тип люминесцентных меток, используемых для визуального и инструментального определения различных аналитов с помощью разнообразных вариантов анализа. Высокий квантовый выход, фотостабильность, узкие спектры испускания, широкий спектр возбуждения данных частиц, делают их идеальными метками для анализа, позволяя разрабатывать методики одновременного определения нескольких веществ и добиваться низкого предела обнаружения[1,2].

Отдельным классом аналитических систем на основе КТ являются ферментные люминесцентные системы, в которых для определения концентрации аналита используется изменение характеристик фотолюминесценции квантовых точек в присутствии ферментов (продуктов ферментативной реакции). Преимуществами систем, основанных на тушении фотолюминесценции КТ, являются простота требований к оборудованию, незатратность, доступность для использования непрофессионалами и использование только разбавления образцов перед анализом без какой-либо другой предварительной обработки, даже если анализируемые объекты имеют сложные матрицы. Описанные биоаналитические системы КТ-фермент применимы в здравоохранении, анализе пищевых продуктов и сельском хозяйстве для большого количества объектов[3].

Другая интересная и развивающаяся группа аналитических подходов основана на тушении фотолюминесценции КТ в присутствии низкомолекулярных компонентов, которые могут выступать в качестве аналитов. Развитие таких систем открывает возможности использование достаточно простых форматов анализа, однако требует детального исследования процессов переноса энергии/электрона и кинетики взаимодействия в растворах, особенно в сложных биоматрицах.

В докладе обобщены недостатки опубликованных аналитических систем, препятствующие их коммерческому применению, а так же поиск возможных решений. Рассматриваются как подходы к повышению чувствительности и мультиплексности анализа, так и инструменты регулирования селективности – на основе свойств самих КТ, а так же дополнительно используемых рецепторов.

Литература

1. Абрамова А.М., Горячева О.А., Дрозд Д.Д., Новикова А.С., Пономарева Т.С., Строкин П.Д., Горячева И.Ю., Люминесцентные полупроводниковые квантовые точки в химическом анализе, Журнал аналитической химии, 2021, том 76, № 3, с. 195–207.
2. Пономарева Т.С., Новикова А.С., Абрамова А.М., Горячева О.А., Дрозд Д.Д., Строкин П.Д., Горячева И.Ю., Применение низкотоксичных квантовых точек нового поколения структуры I-III-VI2 в анализе, Журнал Аналитической Химии, 2022, том 77, № 4, с. 312–320.
3. Speranskaya E.S., Drozd D.D., Pidenko P.S., Goryacheva I.Yu., Enzyme modulation of quantum dot luminescence: application in bioanalysis, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2020, 127, 115897.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 23-13-00380.

ВЛИЯНИЕ G-КВАДРУПЛЕКСНЫХ СТРУКТУР В ПРОМОТОРАХ ГЕНОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ МЫШИ DNMT3A

Громова Е.С., Лойко А.Г., Сергеев А.В., Генатуллина А.И.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр.3, e-mail: gromova@belozersky.msu.ru

У млекопитающих метилирование *de novo* остатков цитозина в CpG-сайтах ДНК осуществляется ДНК-метилтрансферазой (МТазой) Dnmt3a. Изменение статуса CpG-метилирования в промоторах генов важно для регуляции их экспрессии и может приводить к развитию онкологических заболеваний. Вблизи CpG-сайтов в промоторах располагаются гуанин-богатые последовательности, формирующие G-квадруплексы (G4). Недавно было обнаружено потенциальное участие G4 в контроле метилирования ДНК. Целью данной работы стало установление взаимосвязи между наличием параллельных G4 в ДНК и функционированием МТазы Dnmt3a и ее отдельных доменов *in vitro* с использованием модельных ДНК, включая фрагмент онкогена c-MYC.



Рисунок 1. *Модельные ДНК: система с $(GGGT)_4$ и модифицированный фрагмент промотора c-MYC. Сайты CpG подчеркнуты; TAMRA и FAM – флуорофоры, стрелки указывают место расщепления эндонуклеазой Hin6I (сайт Hin6I GCGC).*

В качестве моделей использовали (i) G4-олигонуклеотиды TT(GGGT)4T или c-MYC $T(G)_4A(G)_3T(G)_4A(G)_3T(G)_4AAGG$, способные сворачиваться в параллельные квадруплексы разной конформации и (ii) $(GGGT)_4$–ДНК и c-MYC-ДНК с G4-олигонуклеотидами в виде выпетленных вставок (рис.1). Варьировали расстояние от CpG в сайте Hin6I до G4 (за метилированием следили по защите от расщепления). Показано, что каталитический домен Dnmt3a, в отличие от регуляторного домена, эффективно связывается с G4-олигонуклеотидами. Такая же тенденция наблюдалась и в случае G4-ДНК. Метилирующая активность Dnmt3a эффективно ингибируется в присутствии G4-олигонуклеотидов за счет вытеснения 30-звенного ДНК-субстрата из ДНК-белковых комплексов. Образование G4 снижает степень метилирования $(GGGT)_4$–ДНК и фрагмента промотора c-MYC. Уменьшение расстояния между G4 и CpG-сайтом приводит увеличению этого эффекта. Эффекты гипометилирования можно объяснить секвестированием Dnmt3a на структуре G4 и нарушением олигомеризации фермента на поверхности ДНК ввиду присутствия неканонической структуры. Формирование G4 в промоторе онкогена c-MYC можно рассматривать как одну из причин гипометилирования ДНК.

Поддержано грантом РНФ №22-24-00368.

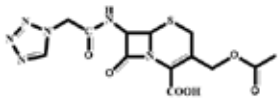
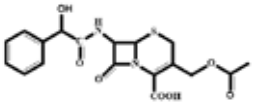
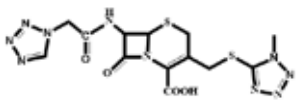
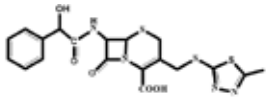
БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ НОВЫХ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ

Скляренко А.В., Грошкова И.А., Горбунов Н.А., Яроцкий С.В.

НИЦ Курчатовский Институт, 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1,
e-mail: ingagrosh@mail.ru

Новые «химерные» цефалоспориновые соединения, состоящие из β-лактамной и ацильной частей известных антибиотиков с подтверждённой антибактериальной активностью, были получены методом кинетически-контролируемого синтеза с использованием фермента рекомбинантной синтетазы цефалоспоринов-кислот (CASA) [1, 2]. Структуры «химерных» цефалоспоринов, подтвержденные методом ВЭЖХ-МС, и достигнутые выходы при получении этих соединений представлены в табл. 1.

Таблица 1. Синтезированные «химерные» цефалоспорины

№	Структуры «химерных» соединений		Выход, %
1		7-ACA_TzAA	96.6±1.5
2		7-ACA_MA	88.6±2.0
3		TMCA_TzAA	91.4±1.6
4		TDA_MA	56.0±1.8

На микроорганизмах видов *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* и др. проведено сравнительное тестирование биологической активности «химерных» соединений 1-4 и антибиотиков цефазолина (TDA_TzAA) и цефамандола (TMCA_MA). Установлено, что на тест-культурах, чувствительных к действию цефазолина и цефамандола, все синтезированные «химеры» проявляют биологическую активность, причем активность соединений 2 и 4, несущих остаток манделовой кислоты, сопоставима или немного превосходит активность цефазолина и цефамандола.

Литература
1. Эльдаров М.А., Скляренко А.В., Думина М.В., и др. *Биомедицинская химия*, 2015, **61**, 5, 646–651.
2. Скляренко А.В., Грошкова И.А., Горбунов Н.А., Яроцкий С.В. *Биотехнология*, 2022, **38**, 2, 43-56.

Работа выполнена в рамках Тематического плана НИЦ «Курчатовский институт» на 2023 год.

КОНЪЮГАТЫ АПТАМЕРОВ С ПЕРОКСИДАЗОПОДОБНЫМ ДНКЗИМОМ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ РЕПОРТЕРЫ ДЛЯ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВЫХ БИОМАРКЕРОВ

Давыдова А.С., Кожев А.А., Воробьева М.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской Академии Наук, 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева 8, e-mail: anna.davydova@niboch.nsc.ru

Детекция биомаркеров различной природы является важной и актуальной задачей клинической диагностики для своевременной постановки диагноза и контроля назначаемой терапии. Одним из наиболее распространенных вариантов детекции является иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на использовании моноклональных антител, и белковых ферментов (пероксидаза, щелочная фосфатаза и др.) для получения аналитического сигнала после реакции с хромогенным субстратом. К его достоинствам относятся высокая чувствительность и селективность анализа. Тем не менее, применение белковых ферментов в качестве компонентов аналитических систем имеет ряд ограничений. Они чувствительны к условиям хранения и транспортировки и могут со временем терять свою каталитическую активность, что приводит к получению недостоверных результатов. В настоящее время активно разрабатываются небелковые альтернативы на основе комплексов нуклеиновых кислот, наночастиц и нанотрубок, обладающие пероксидазной каталитической активностью, которые могут заменить классический фермент при генерации аналитического сигнала [1, 2]. Среди них наиболее перспективным нам представляется нековалентный комплекс гемина с квадруплекс-формирующим ДНКзимом [3], который можно использовать как в традиционных системах ИФА на основе антител, так и в составе диагностических систем на основе аптамеров. В рамках данной работы мы исследовали принципиальную возможность использования пероксидазоподобного ДНКзима для детекции белкового биомаркера с помощью 2›-F-РНК-аптамеров, связывающих интерлейкин-17А человека [4]. Для этого были химически синтезированы единые химерные молекулы, включающие нуклеотидные последовательности аптамера и ДНКзима. Было экспериментально показано формирование активного каталитического комплекса ДНКзима с гемином, осуществляющего окисление хромогенного субстрата ТМВ в присутствии перекиси водорода, в составе химерных конструкций. Полученные аптамер-ДНКзимные конструкции были успешно использованы в качестве компонентов гетерофазной системы детекции в микропланшетном формате. В этой системе конъюгат ДНКзима с аптамером одновременно выступает и в качестве узнающего элемента, отвечающего за специфическое связывание белковой мишени, и в качестве репортерной молекулы, генерирующей аналитический сигнал.

Таким образом, предложенные в данной работе химерные конструкции могут быть использованы в качестве компонентов колориметрических систем детекции белковых биомаркеров.

Литература

1. Kosman J, Juskowiak B. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2020, **170**, 59-84.
2. Yang J, Dai H, Sun Y, Wang L, Qin G, Zhou J, Chen Q, Sun G. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2022, **414**, 2971-2989.
3. Travascio P, Li Y, Sen D. *Chem Biol.,* 1998, **5**, 505-17.
4. Ishiguro A., Akiyama T., Adachi H., Inoue J.I., Nakamura Y. *Arthritis Rheum*., 2011, **63**, 455–466.

Работа поддержана совместным грантом РНФ и Правительства Новосибирской области № 2215-20050.

ДИЗАЙН ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИТРОМБОЦИТАРНЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ МОДИФИКАЦИЙ СКЭФФОЛДА

Демина О.В.[1], Беликов Н.Е.[1], Синауридзе Е.И.[2,3], Пантелеев М.А.[2,3], Атауллаханов Ф.И.[2,3], Варфоломеев С.Д.[1], Ходонов А.А.[1]

[1] ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, РФ, e-mail: olvicdem@gmail.com

[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, РФ

[3] Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, Москва, РФ

Поиск новых химических соединений в качестве прототипов антиагрегационных средств для комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний стимулируется ростом популяции пожилых людей с набором хронических заболеваний, а также наличием множества побочных эффектов и недостаточной эффективностью применяемых антиагрегационных средств (аспирина, индометацина и др.). Актуальными мишенями для этого являются рецепторы простаноидов мембраны тромбоцита, а также рецепторы тромбина, фибриногена и аденозиндифосфата.

Целью данного исследования являлось выявление пространственных ограничений для объемных заместителей в положении 5 серии 5-замещенных 3-(3-пиридил)изоксазолов и их производных, модификация основного скэффолда с получением серий на основе 3-фенилизоксазола и 3-пиридил-1,2,4-оксадиазола и исследование их антиагрегационных свойств при использовании арахидоновой кислоты и U46619 как индукторов агрегации [2].

Для разработки новых прототипов антитромбоцитарных средств путем модификации нашего скэффолда – 3-пиридилизоксазола исследованы пространст-венные ограничения для объемных заместителей в положении 5 изоксазольного кольца. Серия **I** соединений на основе 3-(3-пиридил)изоксазола и его 4,5-дигидропроизводных показала антитромбоцитарную активность в фармакологическом диапазоне IC_{50} [1]. Показано, что все исследуемые вещества подавляли агрегацию тромбоцитов, вызван-ную арахидоновой кислотой или миметиком тромбоксана A_2.

Показана перспективность соединений серии **I** для создания новых антитром-боцитарных препаратов. Показано наличие антитромбоцитарной активности для всех протестированных серий веществ при использовании U-46619 или арахидоновой кислотой как индукторов агрегации.

Литература

1. Демина О.В., Беликов Н.Е., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. Производные изоксазо-ла, обладающие антиагрегационной активностью. / Патент РФ № 2726127 (09.07.2020).

2. Беликов Н.Е., Ходонов А.А., Варфоломеев С.Д., Демина О.В. Влияние 3-(3-пиридил)-5-фенилизоксазола, его биоизостера и позиционного изомера на агрегацию тромбоци-тов человека, вызванную U46619. // Труды XXI ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-вузы «Биохимическая физика». Москва, 15–16 ноября 2021 г. – Москва: РУДН. – 2022. – С. 22-29. ISBN 978-5-209-11222-8.

Работа частично выполнена в рамках Государственного задания ИФАВ РАН 2022 года (тема № 122041300210-2) и частично поддержана грантом РФФИ № 20-03-00139_а.

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ПЕПТИДИЛ-ПРОЛИЛ ЦИС/ ТРАНС ИЗОМЕРАЗА FKBP-ТИПА КАК ИНДУКТОР УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ФИТОПАТОГЕННЫМ ГРИБАМ И ВИРУСАМ

Джавахия В.Г.

Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии Российской Академии Наук, 1430050, Московская обл., Большие Вязёмы, ВНИИФ, e-mail: dzhavakhiya@yahoo.com

Ведение современного интенсивного сельскохозяйственного производства подразумевает применение достаточно эффективных средств защиты промышленно возделываемых культур от болезней. В настоящее время большую часть таких средств составляют синтетические пестициды, которые являются, как правило, ксенобиотиками, которые могут наносить вред окружающей среде. В связи с этим становится актуальной разработка экологически приемлемых технологий защиты сельскохозяйственных культур от болезней. Одно из перспективных направлений при разработке таких технологий связано с использованием биогенных элиситоров болезнеустойчивости, так как они не являются загрязняющими агроценозы ксенобиотиками и не обладают биоцидной активностью, способствующей отбору резистентных форм у патогенов. Пептидил-пролил цис/транс изомеразы FKBP-типа (ППИ-азы) – широко распространенные в природе ферменты, ответственные за фолдинг белковых молекул. Нами впервые было обнаружено, что одна из таких ППИ-аз, продуцируемая ризосферной бактерией *Pseudomonas fluorescens*, проявляет свойственную элиситорам защитную активность[1,2]. Так, обработка ею приводит к развитию системной устойчивости у ряда двудольных и однодольных сельскохозяйственных растений к вирусам, грибам и бактериям. Многократно показанный защитный эффект этой ППИ-азы, подтвержденный в полевых условиях, ее высокая термостабильность и редкая для существующих ныне средств защиты растений способность индуцировать устойчивость сельскохозяйственных культур не только к грибным и бактериальным патогенам, но и к фитовирусам[3], делают этот белок привлекательным в качестве действующего компонента будущих биопрепаратов. Отсутствие прямого биоцидного воздействия на фитопатогены должно позволить свести к минимуму вероятность развития к нему резистентности. Совместно с сотрудниками ФИЦ Биотехнологии РАН, мы разработали технологию получения микрочастиц из биоразлагаемых полимеров, загруженных ППИ-азой. Было показано, что в составе таких микрочастиц, ППИ-аза сохраняет свою защитную активность и более устойчива к деградации, вызванной воздействием УФ солнечных лучей или протеолитическими ферментами[4]. В настоящее время проводятся исследования, направленные на решение вопроса о том, вносит ли ферментативная активность ППИ-азы вклад в ее способность индуцировать устойчивость растений к болезням.

Литература

1. Щербакова Л.А., Джавахия В.Г. *Изв. Самарского научн. центра РАН*. 2013, **15,** 1705.
2. Popletaeva S.B., Voinova T.M., Dzhavakhiya V.G. *AIMS Microbiology*. 2018, **4**, 192.
3. Shumilina D., Krämer R., Klocke E., Dzhavakhiya V. *Phytopathol Polonica*, 2006, **41**, 39.
4. Voinova T., Kartashov M., et al. *Biocatalys Agr. Biotechnol*ogy. 2021, **36**. Article ID 102112.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 22-16-00154)

АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ НА ПРОЛИН ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ БЕЛКОВОЙ ГЛОБУЛЫ ЭКЗО-ИНУЛИНАЗЫ

Доценко А.С.,[а] Савинова О.С.,[а] Рожкова А.М.,[а] Зоров И.Н.[а, б]

[а]ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект 33с2
e-mail: a.dotsenko@fbras.ru
[б]МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет,
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы 1с3

Инулиназы – это ферменты, способные катализировать гидролиз природного полисахарида инулина. Инулин представляет собой линейный полисахарид, состоящий из β-2,1-связанных звеньев фруктозы и обычно с одним концевым звеном глюкозы на молекулу.[1] Инулин является резервным углеводородом, накапливаемым в корнях и клубнях различных растений. Инулиназы характеризуются экзо- или эндо- типом действия на инулин. Экзо-инулиназы катализируют гидролиз фруктозидных связей на невосстанавливающем конце полисахаридной цепи, обеспечивая конверсию инулина во фруктозу. Эндо-инулиназы катализируют гидролиз внутренних фруктозидных связей с образованием фруктоолигосахаридов.[2] Экзо-инулиназы используются для получения высокофруктозного сиропа как замены сахарозе в пищевой и фармацевтической промышленности. А эндо-инулиназы – для получения фруктоолигосахаридов как функциональных продуктов питания и пребиотиков.[3]

Поскольку промышленный процесс конверсии инулина в высокофруктозный сироп включает стадию экстракции инулина из измельченных клубней растений при температуре до 80°C, то перед стадией ферментативного гидролиза под действием экзо-инулиназы необходимо охлаждать раствор инулина или использовать термостабильный фермент. Экзо-инулиназа *Aspergillus awamori* характеризуется достаточно высокой термостабильностью, температура плавления T_m составляет 73,2°C (ДСК). Однако термостабильность этого фермента должна быть дополнительно увеличена для применения в промышленном процессе конверсии инулина.

В данной работе, осуществлены аминокислотные замены S322P, T521P и E523P в структуре экзо-инулиназы *A. awamori*. Замена S322P входит в состав α-спирали N-концевого каталитического домена. Замены T521P и E523P входят в состав петли и β-листа, соответственно, С-концевого домена. Замены позволили увеличить термостабильность фермента при сохранении ферментативной активности по отношению к инулину.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Государственное соглашение 075-15-2022-1226 от 17.10.2022.

Литература

1. Ahmed W., Rashid S. Functional and therapeutic potential of inulin: a comprehensive review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,* 2019, **59**, 1–13.
2. Ohta K., Akimoto H., Moriyama S. Fungal inulinases: enzymology, molecular biology and biotechnology. *J. Appl. Glycosci.*, 2004, **51**, 247–254.
3. Rawat H.K., Soni H., Treichel H., Kango N. Biotechnological potential of microbial inulinases: recent perspective. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2017, **57**, 3818–3829.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ HEK293A С НОКАУТОМ ПО ГЕНУ ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1 ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТОПОТЕКАНА И ИНГИБИТОРА TDP1

Дырхеева Н.С., Захаренко А.Л., Малахова А.А., Медведев С.П., Закиян С.М., Лаврик О.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, пр. Лаврентьева 8, Новосибирск, Россия
dyrkheeva.n.s@gmail.com

Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) – фермент репарации ДНК, который удаляет с 3'-концов ДНК ковалентные аддукты различного происхождения, в том числе образованные под действием противоопухолевых препаратов топотекан и иринотекан. Эти цитостатические препараты применяются при лечении рака шейки матки, яичников и мелкоклеточного рака легкого. Их противоопухолевая активность основана на способности ингибировать работу фермента топоизомеразы 1 (Top1), стабилизируя ковалентные комплексы Top1-ДНК, возникающие в ходе каталитической реакции фермента. Такая стабилизация приводит к накоплению разрывов ДНК и гибели опухолевых клеток. Способность Tdp1 удалять такие аддукты путем гидролиза ковалентной связи Top1-ДНК приводит к снижению эффективности ингибиторов Top1. Таким образом, Tdp1 может быть одним из факторов резистентности опухолевых клеток к этим препаратам [1]. Поэтому дополнительное использование в химиотерапевтических коктейлях ингибиторов Tdp1 является перспективной стратегией поиска новых потенциальных противораковых препаратов с целью повышения чувствительности опухолевых клеток к топотекану.

Нашим коллективом обнаружен ряд производных природных биологически активных соединений – ингибиторов Tdp1 [2]. Одно из соединений-лидеров, гидразонотиазольное производное усниновой кислоты OL9-119, проявило выраженный сенсибилизирующий эффект на цитотоксическое действие топотекана *in vitro* и на его противоопухолевое действие на мышах *in vivo*. Для исследования роли фермента Tdp1 в репарации повреждений ДНК, вызванных топотеканом и соединением OL9-119, мы провели секвенирование транскриптомов клеток линии почек эмбриона человека HEK293A дикого типа, а также с нокаутом по Tdp1, обработанных указанными соединениями отдельно или в комбинации (топотекан + OL9-119). Было исследовано три клеточных клона с нокаутом по Tdp1. При сравнении клеток дикого типа с нокаутными по Tdp1 найдены несколько сотен дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ) с изменениями как в сторону повышения, так и снижения экспрессии. Диаграммы Венна показали, что для трех клонов было найдено по несколько ДЭГ с повышенной экспрессией и сниженной экспрессией по сравнению с клетками дикого типа в том числе в процессах, связанных с процессингом белков. При обработке препаратами наибольшие изменения в экспрессии генов как в сторону повышения, так и снижения экспрессии наблюдаются в сигнальных путях, связанных с апоптозом, контролем клеточного цикла.

Литература
1. Comeaux E.Q., Waardenburg R.C. *Drug Metab. Rev*., 2014, **46**, 494-507.
2. Zakharenko A., Dyrkheeva N., Lavrik O. *Med Res Rev*., 2019, **39**, 1427-1441.

Работа выполнена при поддержке РНФ, проект 21-14-00105.

АКТИВНОСТЬ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗ НА НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТРУКТУРАХ ДНК

Дятлова Е.А.,[а] Ерошенко Д.А.,[б] Жарков Д.О.,[а,б]

[а] Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Ак. Лаврентьева, 8
e-mail: jannie.lapt@gmail.com
[б] Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Сохранение целостности генома – необходимое условие выживания всех живых организмов. Одна из самых важных клеточных систем, отвечающая за исправления повреждений в ДНК – эксцизионная репарация оснований. Каскад последовательных реакций запускает фермент ДНК-гликозилаза, которая узнает поврежденное звено (азотистое основание или АП-сайт) среди нормальной ДНК и удаляет его. Хотя геномная ДНК существует в клетке в основном в B-форме, на разных этапах клеточного цикла формируются и другие (далее – неканонические) функционально важные структуры ДНК. К таким структурам относятся крестообразная ДНК, шпильки, триплексы, квадруплексы, интеркалирующие мотивы (i-мотивы), одноцепочечная ДНК, нуклеотидные выпетливания, Z-ДНК, гетеродуплексы ДНК/РНК, D-петли. Некоторые из них представляют собой регуляторные элементы генома и обеспечивают его стабильность, другие образуются как интермедиаты в патологических процессах. Неканоническая ДНК крайне чувствительна к повреждающим агентам, что может приводить к нарушению регуляции генов и тяжелым заболеваниям [1-2]. Механизмы репарации поврежденных оснований в таких структурах изучены слабо.

В данной работе была проведена качественная и количественная оценка активности основных ДНК-гликозилаз *E. coli* (урацил-ДНК-гликозилаза Ung, формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза Fpg, эндонуклеаза VIII Nei) и млекопитающих (урацил-ДНК-гликозилаза UNG человека, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза OGG1 человека, эндонуклеазы VIII NEIL1 и NEIL2 мыши) на олигонуклеотидных моделях различных неканонических структур ДНК, содержащих поврежденные основания или нуклеотиды – урацил, 5-гидроксиурацил, 8-оксогуанин. Качественная оценка гликозилазной активности проводилась на крестообразных и шпилечных структурах ДНК, параметры стационарной кинетики получены для гетеродуплексов ДНК/РНК и 1–2-никлеотидных выпетливаний, кинетика одного оборота и/или кинетика фазы всплеска проводилась для выпетливаний, гетеродуплкесов ДНК/РНК, i-мотивов и G-квадруплексов.

По результатам работы можно заключить, что способность большинства ДНК-гликозилаз узнавать и удалять повреждение из ДНК неканонической структуры зависит от локализации повреждения и его доступности для аминокислот каталитического центра. В тех случаях, когда ферменты проявляли активность, каталитическая эффективность реакций была заметно ниже в сравнении с активностью на каноническом для фермента ДНК-субстрате.

Литература
1. McMurray C.T. Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. Nat. Rev. Genet., 2010, 11, p. 786-799.
2. Zhao X., Krishnamurthy N., Burrows C.J., David S.S. Mutation versus repair: NEIL1 removal of hydantoin lesions in single-stranded, bulge, bubble, and duplex DNA contexts. Biochemistry, 2010a, 49, p. 1658-1666.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 17-14-01190П.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Евтушенко Е.Г.,[а,б] Гаврилина Е.С.,[а] Васильева А.Д.,[а] Юрина Л.В.,[а] Курочкин И.Н.[а,б]

[а]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук»,
119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4,
e-mail: evtushenko@enzyme.chem.msu.ru
[б]Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Химический факультет,
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

В настоящее время сложно себе представить область медицинской диагностики без иммуноферментного анализа (ИФА). В клиническую практику постоянно внедряются новые маркеры патологических состояний, присутствующие в биологических образцах во все более низких концентрациях. Также для ряда применений усиливаются требования к экспрессности получения результата ИФА. Эти тренды мотивируют поиск новых, более чувствительных систем регистрации продуктов пероксидазной ферментативной реакции для использования в ИФА. Одним из перспективных вариантов может служить спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) [1]. Используя реакцию окислительной димеризации о-фенилендиамина в 2,3-диаминофеназин под действием H_2O_2 в присутствии пероксидазы из корней хрена, а также золи серебряных наночастиц [2] со средним размером 40 нм в качестве ГКР субстрата, был разработан прототип системы регистрации результатов ИФА с пределом обнаружения по пероксидазе 0.03-0.05 пМ в объеме 20 мкл при длительности проведения ферментативной реакции 10 минут. Колориметрическая регистрация в той же паре субстрат-продукт при длине волны 454 нм с использованием планшетного спектрофотометра демонстрирует предел обнаружения 4.7 пМ. Таким образом, использование ГКР позволяет примерно на 2 порядка улучшить предел обнаружения пероксидазы – широко используемой в ИФА ферментативной метки.

Дальнейшее совершенствование данной аналитической методики невозможно без глубокого понимания физико-химических особенностей взаимодействия о-фенилендиамина и 2,3-диаминофеназина с поверхностью серебра, происходящего в процессе анализа. В докладе будут детально обсуждено влияние кислотно-основных равновесий на сродство этих двух молекул к поверхности серебра.

Литература
1. Курочкин И.Н., Васильева А.Д., Евтушенко Е.Г., Еременко А.В., Пергушов Д.В., Сиголаева Л.В. В*ес*тн. Моск. ун-та. Сер. *2.* Химия, 2023. **64**(4), 311.
2. Leopold N., Lendl B. *J. Phys. Chem. B, 2003.* **107, 5723.**

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 22-14-00213. В работе использовали оборудование, приобретенное по Программе развития МГУ.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ДНК- И ФЕРМЕНТНЫЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ПИЛЛАРАРЕНОВ КАК МЕДИАТОРОВ ЭЛЕКТРОННОГО ПЕРЕНОСА

Евтюгин Г.А., Шамагсумова Р.В., Шурпик Д.Н., Стойков И.И.

Химический институт им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18
e-mail: Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

Макроциклические производные, содержащие гидрохиноновые фрагменты, соединенные метиленовыми мостиками, – пилларарены – новые перспективные медиаторы электронного переноса, способные улучшать характеристики биосенсоров за счет повышения эффективности переноса электрона, предконцентрирования аналитов в составе комплексов «гость-хозяин» и супрамолекулярной сборки биочувствительного слоя. Нами проведено сравнительное исследование незамещенных пиллар[5]- и пиллар[6]арена, а также частично замещенных пиллар[n]арен[m]хинонов (n+m = 5) (структурные формулы приведены на рисунке) с целью установления механизма их действия и оптимизации условий сборки биочувствительного слоя биосенсора и условий измерения его сигнала.

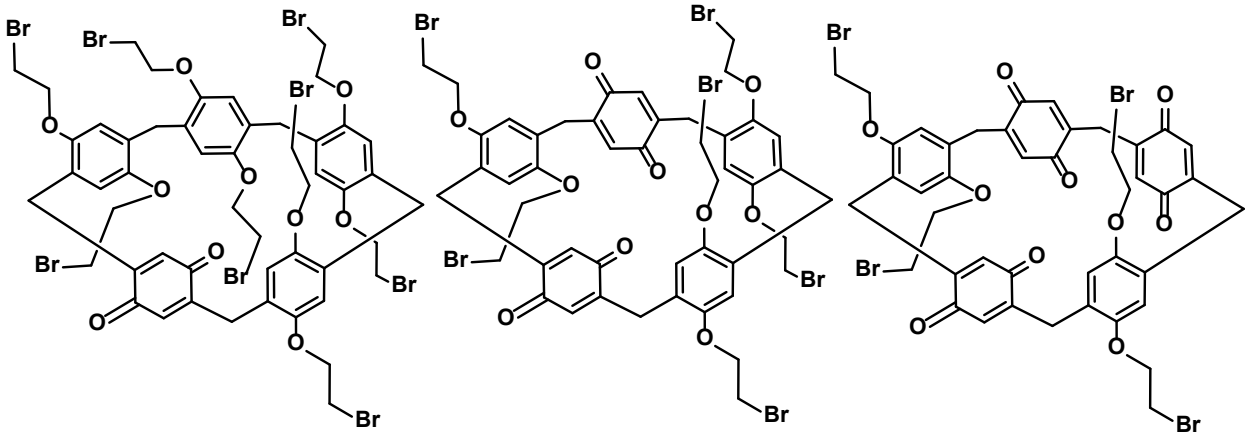


Рисунок. *Структурные формулы пиллар[n]арен[m]хинонов, исследованных в работе*

Выявлен вклад процессов их ассоциации и внутримолекулярных водородных связей на параметры электронного обмена и чувствительность к субстратам/ ингибиторам ферментов и интеркаляторам ДНК. Оптимизированы условия электрополимеризации фенотиазиновых красителей (тионин, Азур Б, метиленовый синий) с включением в состав полимерного слоя пилларарена, предложены условия получения in situ композитов пилларенов с углеродной сажей, многостенными углеродными нанотрубками, восстановленным оксидом графена, а также наночастиц серебра. Модифицированные композитами электроды были использованы для сборки ДНК-сенсоров для определения интеркаляторов ДНК и ДНК-повреждающих факторов, а также ферментных биосенсоров для определения ингибиторов ацетилхолинэстеразы с наномолярными пределами обнаружения ингибиторов – лекарственных препаратов и пестицидов, мочевой кислоты и тирозина. Установлено влияние макроциклических производных на аналитические и операционных характеристики биосенсоров и возможности направленного изменения селективности отклика в зависимости от решаемых аналитических задач.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00070, https://rscf.ru/project/22-13-00070.

КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛОКАЛИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВ, ИХ НОСИТЕЛЕЙ И АДЪЮВАНТОВ

Белогурова Н.Г.,[а] Виговский Р.А.,[б,в] Григорьева О.А.,[б,в] Добрякова Н.В.,[а] Дьячкова У.Д.,[б,в] Ежов А.А.,[г] Злотников И.Д.,[а] Кудряшова Е.В.,[а]

[а] МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 3
[б]МГУ им. М.В. Ломоносова, Медицинский научно-образовательный центр, 119192, Москва, Ломоносовский просп. 27, корп. 10
[в] МГУ имени М.В. Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, 119192, Москва, Ломоносовский просп. 27, корп. 1
[г]МГУ им. М.В. Ломоносова, Физический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 2; e-mail: alexander-ezhov@yandex.ru

Флуоресцентная микроскопия, в том числе – конфокальная сканирующая лазерная микроскопия (КЛСМ) – широко применяется для определения локализации тех или иных веществ, либо меченых флуорофорами, либо обладающих собственной флуоресценцией. Наиболее информативным является применение «многоцветной» флуоресценции, позволяющей оценивать компартментализацию и колокализацию целевых веществ. Часто при этом необходимы предварительные исследования спектров возбуждения и эмиссии, позволяющие подобрать оптимальные условия наблюдения. Особенно полезным при таких измерениях является применение микроспектроскопии, позволяющей наблюдать спектры эмиссии непосредственно в клетках, т.е. в условиях, идентичных условиям целевых изменений.

На примере сочетаний таких распространенных в лабораторной практике флуоресцирующих веществ, как 4’,6-диамидино-2-фенилиндол, изотиоцианат флуоресцеина, эозин и родамин [1-4], использовавшихся при исследованиях, направленных на создание комбинированных селектривных мицеллярных цитостатиков, показано, что микроспектроскопия с использованием КЛСМ позволяет наблюдать влияние на одновременное наблюдение нескольких флуорофоров таких характеристик, как конечная ширина и форма спектров возбуждения и эмиссии, а также диапазон концентраций флуорофоров. Наличие экспериментально определенных спектров эмиссиих флуорофоров, находящихся в макрофагах, бактериях, нормальных и опухолевых клетках, позволяет оптимизировать как спектральные, так и концентрационные параметры, необходимые для одновременного наблюдения локализации нескольких флуорофоров.

Литература
1. I.D. Zlotnikov, A.A. Ezhov, R.A. Petrov, M.A. Vigovskiy, O.A. Grigorieva, N.G. Belogurova, E.V. Kudryashova. *Pharmaceuticals*, 15(10):1172, 2022.
2. I.D. Zlotnikov, A.A. Ezhov, M.A. Vigovskiy, O.A. Grigorieva, U.D. Dyachkova, N.G. Belogurova, E.V. Kudryashova. *Diagnostics*, 13(4):698, 2023.
3. I.D. Zlotnikov, D.A. Streltsov, A.A. Ezhov, E.V. Kudryashova.*Pharmaceutics*, 15(4):1135, 2023.
4. 2022I.D. Zlotnikov, N.V. Dobryakova, A.A. Ezhov, E.V. Kudryashova. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(9):8023, 2023.

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ В ОТНОШЕНИИ ИСКУССТВЕННЫХ НУКЛЕОТИДОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В СИНТЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ

Ендуткин А.В.,[а] Юдкина А.В.,[а] Барматов А.Е.,[а] Жарков Д.О.[б]

[а] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8
e-mail: aend@niboch.nsc.ru
[б] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Понятие биоортогональности, возникшее в области синтетической биологии, относится к любой химической реакции, которая может происходить внутри живых систем без вмешательства в естественные биохимические процессы. Впечатляющие успехи в области синтетической химии нуклеиновых кислот делают эти биополимеры одними из самых удобных для осуществления биоортогональных реакций *in situ*. Модификация нуклеиновых кислот, в особенности ДНК, в живых клетках находится под плотным контролем со стороны систем репарации ДНК и ответа на повреждения ДНК. Таким образом, репарация ДНК по определению препятствует реализации биоортогональных свойств модифицированной ДНК, помещенной внутрь живой клетки. Однако, проблема активности систем репарации и ответа на повреждения ДНК по отношению к модификациям, применяемым в синтетической биологии, не была объектом систематических исследований.

Мы изучили взаимодействие ферментов системы эксцизионной репарации оснований ДНК из разных организмов с несколькими классами неприродных нуклеотидных звеньев, используемых в синтетической биологии: нуклеотиды, использующиеся для клик-реакций (C8-алкин-dU, C8-алкин-dC, 5-этинил-dU, 1-этинил-AP сайт), нуклеотиды с альтернативной хиральностью (β-L-нуклеотиды A, C, G и T) и нуклеотиды, образующие модифицированные межнуклеотидные связи (триазольная связь).

Была исследована способность ДНК-гликозилаз человека (и их гомологов или функциональных аналогов из бактерий) удалять основания из ДНК, содержащей неприродные нуклеотиды, способность AP-эндонуклеаз человека и *E. coli* гидролизовать ДНК, содержащую их, и способность ДНК-полимераз корректно включать dNMP напротив таких нуклеотидов. Как правило, C5-модифицированные пиримидины служили субстратами для ДНК-гликозилаз, распознающих продукты дезаминирования 5-метилцитозина, а 1-этинил-АП-сайт был субстратом для АП-эндонуклеаз. Нуклеотиды с инвертированной хиральностью сами по себе не были субстратами для гликозилаз и АП-эндонуклеаз, кроме того блокировали частично или полностью действие ДНК-гликозилаз, находясь напротив специфического нуклеотида. Специфичность полимераз независимо от семейства проявлялась схожим образом. В случае если синтез ДНК не блокировался модификацией, полимеразы образовывали «каноническую» пару или использовали правило «A». Наиболее значимые активности ферментов были кинетически охарактеризованы.

Использование нуклеиновых кислот, содержащих неприродные нуклеотиды, для управления живыми клетками активно развивается и будет развиваться в ближайшие десятилетия. Поэтому вопрос о степени биоортогональности таких молекул будет становиться все более актуальным. Мы показали, что, по крайней мере, некоторые неприродные нуклеотиды, применяемые в синтетической биологии, подвержены репарации ДНК, что стоит учитывать при анализе результатов, полученных с их использованием.

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

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИММУНОАНАЛИЗА БЕЛКОВЫХ АНТИГЕНОВ

Еременко А.В., Сорокина О.Н., Васильева А.Д., Константинова Т.С., Юрина Л.В., Курочкин И.Н.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, ул. Косыгина 4,
e-mail: eremenkoav@yandex.ru

Разработана новая электрохимическая иммуносенсорная платформа для быстрого и высокочувствительного обнаружения белковых антигенов. Принцип работы основан на одностадийном варианте твердофазного иммуноферментного анализа, в котором в качестве твердой фазы используются магнитные частицы с иммобилизованными узнающими молекулами (антитела). Проведение анализа предполагает магнитную сепарацию целевых антигенов с последующим связыванием со вторыми антителами, конъюгированными с ферментом щелочной фосфатазой, которая обеспечивает образование электрохимически активного продукта. Разработанная методика анализа на примере N-белка вируса SARS-CoV-2 с использованием магнитной сепарации и электрохимической регистрацией продукта ферментативной реакции 1-нафтола на планарных электродах (производство ООО «Компания «Элта») в режиме дифференциальной импульсной вольтаметрометрии позволяет определять антиген с пределом обнаружения 10 пг/мл. Экспериментальная оценка аналитических характеристик разработанной тест-системы показала, что предел обнаружения вируса SARS-CoV-2 (штамм Ухань) составляет 100 вирусных частиц в миллилитре, время анализа 20 минут.

Аналогичная схема иммуноанализа была реализована для определения Тропонина I – клинически значимого маркера при диагностике и лечении острого инфаркта миокарда. Диапазон определяемых концентраций Тропонина I в сыворотке крови составляет 0,1-100 нг/мл при времени анализа 20 минут. Сравнительные исследования, проведенные с клиническими образцами, показали достаточно хорошее совпадение определяемых концентраций Тропонина I в сыворотке крови на автоматическом анализаторе Mindray и разработанным методом.

Таким образом, разработанная аналитическая платформа является универсальным базовым методом для дальнейшего развития иммуноферментного анализа других антигенов при наличии специфических антител к ним.

Приведенные результаты получены в рамках бюджетного финансирования по теме 122041400080-0 и финансовой поддержке ООО «Компания «Элта».

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА) НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ТОКСИКАНТОВ

Еремин С.А.

М.В. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Ленинские горы 1, Россия
Keywords: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Иммунохимические методы все более широко используются для определения загрязнителей в медицине, пищевой промышленности и объектах окружающей среды. Иммунные методы основанны на использовании специфических и высокоаффинных антител как распознающий реагент. Иммуноферментный анализ (ИФА), в котором в качестве метки используется фермент пероксидаза хрена, является одним из основных используемых иммунометодов. Мы показали, что чувствительность ИФА существенно зависит от того какое производное аналита используется для получения конъюгатов с белками. Совместно с китайскими коллегами представлены данные по разработке ИФА на 3-нитротирозина в моче, атразина в лечебных травяных корнях, оксамигидразида, метаболита нитрофуранового антибиотика нифуралдезона, в курином мясе. Предел обнаружения загрязнителей был на уровне 1-10 нг/мл и практически 100% специфичность. Более подробную информацию можно найти в наших публикациях:

Литература

1. Qiyi He, Yingshan Chen, Ding Shen, Xiping Cui, Chunguo Zhang, Huiyi Yang, Wenying Zhong, Sergei A. Eremin, Yanxiong Fang. Suqing Zhao. Development of a surface plasmon resonance immunosensor and ELISA for 3-nitrotyrosine in human urine. Talanta, 195, 655-661 (2019). DOI: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.110
2. Yu-Dan Wang, Jia-An Qin, Liu Wu, Bao-Min Wang, Sergei Eremin, Shi-Hai Yang, Mei-Hua Yang. Enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic strip for rapid detection of atrazine in three medicinal herbal roots. World Journal of Traditional Chinese Medicine, 7(1), 97- (2021). DOI: 10.4103/wjtcm.wjtcm_76_20
3. Ghulam Mujtaba Mari, Weilin Wu, Aisha Talpur, Jan Muhammad Shah, Saqib Ali, Faiz Khand, Erum Bughio, Abdul Samad, Zhanhui Wang, Sergei A. Eremin. Hapten design to prepare monoclonal antibodies and establishment of immunoassay for direct screening of oxamichydrazide in chicken, the metabolite of nifuraldezone. One Health Adv. 1, 6 (2023). https://doi.org/10.1186/s44280-023-00006-y

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова 121041500039-8 "Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды"

ФЕРМЕНТЫ В МЕХАНИЗМАХ ИНДУЦИРОВАННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Ерохин Д.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии Российской Академии Наук, 1430050, Московская обл., Большие Вязёмы, ВНИИФ, e-mail: erokhin.denis.v@gmail.com

Использование естественного иммунитета культурных растений против патогенных микроорганизмов открывает широкие перспективы для успешного развития устойчивого сельского хозяйства. При этом особый интерес вызывает неспецифическая индуцированная устойчивость (ИУ) [1] к широкому спектру фитопатогенов. По типу эндогенных сигнальных молекул и путям метаболизма растений, участвующим в формировании ИУ, различают приобретенную системную устойчивость (SAR) и индуцированную системную устойчивость (ISR), которые приводят к продолжительной устойчивости всего растения после локальной индуцирующей обработки. Для создания препаратов на основе индукторов ИУ необходимо понимание механизмов их действия, изучаемых преимущественно путем анализа экспрессии маркерных генов, характерных для SAR или ISR. В связи с тем, что ферменты участвуют во всех ключевых этапах развития ИУ, комплексный анализ экспрессии генов некоторых ферментов и содержания вторичных метаболитов растений, биосинтез которых они катализируют, может служить одним из надежных инструментов для изучения механизмов действия индукторов устойчивости наряду с анализом экспрессии маркерных генов SAR и ISR. Исследуемый нами индуктор MF3[2] был выделен из рост-стимулирующей ризобактерии *Pseudomonas fluorescens*. Несмотря на то, что структура MF3 и кодирующего его гена были определены[3], а защитный эффект этого индуктора против основных типов фитопатогенов подтвержден на многих культурах результатами вегетационных опытов и полевых испытаний, механизм его действия на молекулярном уровне остается неизученным. Анализ динамики накопления транскриптов генов *pdf 1.2* и *chiB*, участвующих в биосинтезе этилена и жасминовой кислоты и ассоциированных с ISR, показал отсутствие изменения экспрессии этих генов в обработанных MF3 листьях табака, по сравнению с контрольными образцами. Анализ динамики накопления транскриптов генов изохоризматсинтазы *ics1* и фенилаланинлиазы *pal*, участвующих в биосинтезе салициловой кислоты и ассоциированных с SAR, показал усиление в 3,5 раза экспрессии *ics1* на вторые сутки в обработанных MF3 листьях табака, по сравнению с контрольными образцами. Также было показано увеличение в 2 раза накопления свободной салициловой кислоты на вторые сутки в обработанных MF3 листьях табака, по сравнению с контрольными образцами. Полученные данные свидетельствуют о вероятном механизме действия MF3 по типу SAR.

Литература
1. Jones, J., Dangl, J. *Nature*. 2006, **444**, 323.
3. Shumilina D., Krämer R., Klocke E., Dzhavakhiya V. *Phytopathol Polonica*, 2006, **41**, 39.
4. Dzhavakhiya V. et al. *pat. PCT WO2005/061533 A1*, Publ. date 07.07.2005.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 22-16-00154)

ДВА ТИПА АПТАМЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ОПУХОЛЕВОГО МАРКЕРА CA125 С ПОМОЩЬЮ ЧИПОВ К АТОМНО-СИЛОВОМУ МИКРОСКОПУ

Ершова М.О., Валуева А.А., Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича», 119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8
e-mail: mo.ershova@mail.ru

В настоящее время биоспецифическое образование комплексов зонд-мишень используется во многих областях биомедицинских исследований. В качестве молекулярных зондов могут быть использованы биомолекулы, обладающие аффинными свойствами, к котором относят антитела и их производные, аптамеры, сомамеры и синтетические пептиды. В данной работе в качестве молекулярного зонда использованы аптамеры, которые обладают рядом преимуществ перед антителами, включая простоту синтеза, удобную модификацию, стабильность в условиях хранения и анализа. В качестве метода оценки эффективности комплексообразования зонд-мишень использовалась атомно-силовая микроскопия (АСМ), которая предоставляет возможности для изучения структуры и свойств биологических объектов, в том числе белков, нуклеиновых кислот, белок-белковых комплексов.

Белок CA125 (антиген) был детектирован в растворе с концентрацией 10^{-9} М с помощью АСМ-чипа с иммобилизованными аптамерами. Использованы два типа зондов: коммерчески доступный аптамер с неопубликованной последовательностью от производителя BasePair Biotechnologies (США) (аптамер №1) и аптамер с известной последовательностью, синтезированный в «Евроген» (Россия) (аптамер №2 - 5’-TAGGGAAGAGAA GGACATATGATTTTAGGGAAGAGAAGGACTTTTATGCCGCCTTGACTAGTACATGACCACTTGA-3’)[1].

В случае аптамера №1 после стадии инкубации АСМ-чипа с иммобилизованными аптамерами в растворе антигена методом АСМ были визуализированы единичные объекты с высотой более 1.4 нм, а в случае аптамера №2 были визуализированы слоистые структуры высотой от 1.2 нм до 1.6 нм. Единичные объекты в случае аптамера №1 и слоистые структуры в случае аптамера №2 были отнесены к образовавшимся комплексам аптамер/антиген, так как в контрольных экспериментах таких объектов и слоистых структур не было визуализировано. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности комплексообразования аптамер/белок на поверхности в процессе инкубации как в случае аптамера №1, так и в случае аптамера №2. Преимущество использования аптамера №2 – возможность синтеза по опубликованной последовательности, что значительно снижает стоимость препарата и делает возможным его модификацию в случае необходимости.

Литература
1. Tripathi P., Sachan M., Nara S. *Frontiers in Chemistry,* 2020, **8**, 400.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№122030100168-2).

МЕХАНИЗМЫ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗ И ПРОБЛЕМА «ИЗБЫТОЧНЫХ РЕАКЦИЙ»

Жарков Д.О.[а,б]

[а]Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2
[б]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8
e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru

Эксцизионная репарация оснований ДНК (BER, от англ. base excision repair) – процесс, отвечающий за удаление из ДНК поврежденных азотистых оснований, незначительно искажающих общую структуру ДНК. Кроме того, BER отвечает за репарацию апурин-апиримидиновых (АП-) сайтов, в которых азотистое основание утеряно. Путь BER инициируется ферментами класса ДНК-гликозилаз, гидролизующими *N*-гликозидную связь поврежденных нуклеотидов по механизму нуклеофильного замещения. После этого ДНК гидролизуется по образовавшемуся в ходе реакции АП-сайту АП-эндонуклеазами. Известны три больших не родственных друг другу структурных суперсемейства и дополнительно несколько не относящихся к ним семейств ДНК-гликозилаз, в которых реакция гидролиза *N*-гликозидной связи возникла и эволюционировала независимо. С точки зрения механизма ДНК-гликозилазы делятся на монофункциональные (катализируют только гидролиз *N*-гликозидной связи) и бифункциональные (катализируют гидролиз *N*-гликозидной связи с последующим β-элиминированием 3′-фосфатной группы, т. н. АП-лиазная реакция). Бифункциональные ДНК-гликозилазы способны расщеплять АП-сайты без участия АП-эндонуклеаз, однако биологическое значение этой реакции остается под вопросом. В работе исследована репарация АП-сайтов *in vitro* и в клеточных репортерных системах изолированными ДНК-гликозилазами и гликозилазами в присутствии АП-эндонуклеаз. Полученные результаты свидетельствуют о возможной роли АП-лиазной реакции в качестве дублирующего механизма репарации АП-сайтов.

Еще одним слабо исследованным аспектом функционирования ДНК-гликозилаз является достаточно широкая субстратная специфичность некоторых из них, в особенности бифункциональных, в экспериментах *in vitro*, при том что ряд поврежденных оснований, узнаваемых *in vitro*, по-видимому, не является субстратами в клетке. При этом практически идентичные по своей пространственной структуре ДНК-гликозилазы могут узнавать разные типы поврежденных оснований, и наоборот, одно и то же повреждение может узнаваться ферментами разных структурных суперсемейств. В ходе работы исследовано влияние аминокислотных замен в субстратсвязывающем центре на активность ряда ДНК-гликозилаз и показано, что такие замены могут оказывать сильное негативное влияние на удаление поврежденных оснований – «природных субстратов», узнаваемых в клетке, при этом не затрагивая активность в отношении «неспецифичных субстратов», узнаваемых только в модельных системах *in vitro*. Это свидетельствует о том, что отбор при эволюции ДНК-гликозилаз направлен на повышение специфичности к определенным поврежденным основанием, но вместе с тем их остаточная активность в отношении прочих повреждений дает возможность для эволюции ферментов с новой субстратной специфичностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, проект АААА-А20-120101690009-7.

ПРИМЕНЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

Жердев А.В., Гендриксон О.Д., Панферов В.Г., Сафенкова И.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Ленинский проспект 33, 119071 Москва; zherdev@inbi.ras.ru

Иммунохроматографические тест-системы широко применяются как средства экспрессного внелабораторного скринингового контроля многих соединений. Реализованные в них принципы сухой химии с предварительным нанесением аналитических реагентов на мембраны тест-полоски и инициацией всех последующих процессов контактом тест-полоски с жидкой пробой обеспечивают простое и быстрое тестирование с визуальной оценкой его результатов. Однако эти же достоинства вызывают и ограничения в пределах обнаружения традиционных тест-систем. Иммунохроматография часто уступает инструментальным иммунохимическим методам по минимальным обнаруживаемым концентрациям целевых аналитов. В связи с этим востребована интеграция иммунохроматографии с подходами, усиливающими аналитические сигналы без существенного усложнения или удлинения тестирования. В сообщении будут представлены разработки по применению в иммунохроматографических тест-системах каталитических процессов.

Предложены и охарактеризованы новые варианты иммунохроматографии: а) с использованием комплексов наночастиц и ферментов, б) с каталитическим наращиванием наночастиц, в) с окислительной трансформацией субстратов нанозимами. Рассмотрены зависимости степени усиления регистрируемого сигнала от состава комплексов наночастиц с иммобилизованными биомолекулами. Определены условия получения данных комплексов, позволяющие наиболее эффективно сочетать сохранение аффинности к антигенам и высокую каталитическую активность. Охарактеризованы процессы восстановления солей металлов на поверхности золотых наночастиц, включенных в состав детектируемых иммунных комплексов по завершении иммунохроматографического процесса. Установлены условия, в которых средние размеры наночастиц на мембранах возрастают в 10-15 раз с выигрышами в пределах обнаружения не менее двух порядков. Сопоставлены нанозимные свойства би- и триметаллических наночастиц (Au@Ag, Au@Ag@Pt), синтезированных в разных условиях. Показаны преимущества гальванического замещения серебра платиной на поверхности наночастиц с формированием каталитически активных кластеров. Проведена сравнительная оценка хромогенных субстратов при их использовании в сочетании с нанозимами, обладающими оксидазной активностью.

Проведенная апробация показала эффективность предложенных подходов к усилению сигнала – компоненты матрикса проб не ингибируют усиливающие процессы и не вызывают неспецифического связывания маркеров. При иммунохроматографическом контроле состава и контаминации пищевых продуктов каталитическое усиление обеспечивает снижение пределов обнаружения от 10 до 500 раз в зависимости от используемых реагентов и схемы проведения тестирования. При этом для развития сигнала достаточно 1-3-минутной продолжительности усиливающей стадии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант 19-16-00108.

ГЛУБОКИЕ ЭВТЕКТИЧЕСКИЕ РАСТВОРИТЕЛИ НА ОСНОВЕ БЕТАИНА И ГЛИЦЕРИНА КАК СРЕДА ДЛЯ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО СИНТЕЗА ПОЛИМЕРОВ

Морозова О.В.,[а] Васильева И.С.,[а] Шумакович Г.П.,[а] Зайцева Е.А.,[б] Ярополов А.И.[а]

[а] Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 105118 Россия
e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru
[б] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

Глубокие эвтектические растворители (ГЭР) являются альтернативой традиционным органическим растворителям и ионным жидкостям благодаря таким преимуществам, как отсутствие токсичности, невоспламеняемость, биоразлагаемость, низкая летучесть, термическая стабильность, простота получения и др. Весьма перспективным является применение ГЭР для проведения биохимических реакций между соединениями с плохой растворимостью в водных растворах.

В настоящей работе представлены результаты биокаталитической полимеризации флавоноидов дигидрокверцетина (ДГК) и (+)-катехина (КХ), а также полимеризации/сополимеризации анилина и 3-аминобензойной кислоты в ГЭР-буферной смеси на основе бетаина и глицерина. В качестве катализатора использовали лакказу из культуральной жидкости базидиального гриба *Trametes hirsuta*, окислителем служил атмосферный кислород.

Изучено влияние ряда ГЭР на основе бетаина на каталитическую активность и стабильность лакказы, показано, что наиболее оптимальным составом является буферная смесь, содержащая 60 об. % ГЭР бетаин/глицерин и 40 об. % буфера. Ферментативную полимеризацию дигидрокверцетина (ДГК) в ГЭР-буферной смеси проводили с помощью редокс-медиатора лакказы TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl), что позволило увеличить выход олигомеров ДГК до 58+7%. Среднечисленная молекулярная масса полученного продукта (Mn) составила 1800 г/моль, а индекс полидисперсности (PDI) - 1,09. Методами ЯМР спектроскопии показано, что полученные олигоДГК имеют линейную структуру со средней длиной цепи в шесть мономерных звеньев.

Для синтеза олигомеров катехина (олигоКХ) в ГЭР-буферной смеси были подобраны условия, при которых образуются 2 продукта, растворимые в органических растворителях. Mn полученных олигоКХ - 10620 и 2540 г/моль, а PDI - 1.1 и 1.09, соответственно. Выход продуктов - 32%. Исследованы физико-химические свойства полученных олигомеров методами УФ-видимой, FTIR, H1 и C13 ЯМР спектроскопии. Полученные олигоКХ в 100 раз более эффективно ингибировали активность α-глюкозидазы (IC50 ~ 8 мкг/мл) по сравнению с мономером КХ (IC50~980 мкг/мл). Сделан вывод, что олигомеры катехина, синтезированные в данных условиях, могут быть перспективной субстанцией для лечения сахарного диабета 2-го типа.

Проведена лакказа-катализируемая матричная полимеризация/сополимеризация анилина и 3-аминобензойной кислоты в ГЭР-буферной смеси. В качестве матрицы использовали полистиролсульфонат натрия. Были получены интерполиэлектролитные комплексы гомополимеров полианилина и поли(3-аминобензойной кислоты, а также сополимера поли(анилин-со-3-аминобензойной кислоты). Физико-химические характеристики полимерных комплексов были изучены с помощью УФ-видимой, FTIR спектроскопии, циклической вольтамперометрии, атомно-силовой микроскопии. Установлено что сополимер проявляет антимикробную активность против *E. coli* и *S. aureus,* превышающую антимикробную активность гомополимеров более, чем в 6 раз. Важно, что ингибирующая способность сополимера, полученного в ГЭР-буферной среде, в несколько раз выше ингибирующей способности сополимера, синтезированного традиционным химическим способом.

Результаты данной работы показывают, что ГЭР-содержащие буферные смеси являются перспективными средами для проведения биокаталитического синтеза полимеров, а полученные продукты с улучшенными свойствами могут быть успешно использованы для медицинских целей.

Работа выполнена в рамках гос. задания тема № 121041500039-8.

BACILLUS SUBTILIS И ДРУГИЕ ВИДЫ *BACILLUS* КАК КЛЕТОЧНЫЕ ФАБРИКИ: ПРЕИМУЩЕСТВА, МЕТОДЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ

Закатаева Н.П.

АО «НИИ Аджиномото-Генетика»,
117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1, корп. 1,
e-mail: Natalia_Zakataeva@agri.ru

Благодаря современным достижениям в области метаболической инженерии и оптимизации процессов культивирования, а также ряду преимуществ по сравнению с другими способами, промышленное биотехнологическое производство различных соединений и ферментов получило широкое распространение. Наряду с *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, видами *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Clostridium* и др., бактерии рода *Bacillus* часто используют как платформу для создания клеточных фабрик для биотехнологических производств. Повышенный интерес к этим микроорганизмам обусловлен тем, что *B. subtilis* и его ближайшие родственники (*Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus licheniformis* и др.) являются непатогенными бактериями, не синтезируют эндотоксины и другие токсичные соединения, и многие из них имеют статус безопасных организмов (GRAS). Большинство штаммов рода *Bacillus* имеют высокую скорость роста на дешевых источниках углерода, устойчивы к неблагоприятным воздействиям и стрессовым факторам. Кроме того, многие из них способны активно выделять в среду культивирования ряд экзоферментов и метаболитов. Важно также, что геномы, транскриптомы и основные реакции клеточного метаболизма этих бактерий хорошо изучены.

В настоящее время на основе *B. subtilis* и других видов *Bacillus* создан ряд промышленных штаммов-продуцентов, которые используют для производства ферментов (амилаз и протеиназ), рекомбинантных белков, антимикробных соединений (пептидных и липопептидных антибиотиков и бактериоцинов), адсорбентов, поверхностно-активных веществ, а также D-рибозы, витаминов (рибофлавина, фолиевой кислоты и др.), пуриновых нуклеозидов (нуклеотидов), полигаммаглутаминовой кислоты и целого ряда других химических веществ, применяемых в промышленности, сельском хозяйстве и медицине.

Доклад знакомит с современными знаниям в области создания клеточных фабрик на основе видов *Bacillus* и включает материалы, посвященные генно-инженерным стратегиям редактирования геномов и их применению для создания промышленных штаммов-продуцентов.

В докладе изложены методы, основанные на использовании гомологичной или гетерологичной сайт-специфической рекомбинации, CRISPR/Cas технологий и др., представлена актуальная информация о наиболее эффективных способах доставки генетического материала в клетки штаммов *Bacillus,* об удобных векторах и маркерах контрселекции, о генетическом инструментарии и т.д. Изложены стратегии редактирования геномов хорошо трансформируемых штаммов, таких как *B. subtilis*, а также особенности конструирования природно не трансформируемых штаммов (на примере *B. amyloliquefaciens* и др. видов *Bacillus*). Материалы лекции содержат примеры применения геномного редактирования и метаболической инженерии для создания промышленно значимых штаммов. Заключительная часть посвящена проблемам и перспективам создания эффективных клеточных фабрик на основе штаммов рода *Bacillus.*

ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗА 1 КАК МИШЕНЬ В ОНКОТЕРАПИИ

Захаренко А.Л.[1], Дырхеева Н.С.[1], Чернышова И.А.[1], Корниенко Т.Е.[1], Филимонов А.С.[2], Лузина О.А.[2], Попова Н.А.[3], Николин В.П.[3], Салахутдинов Н.Ф.[2], Лаврик О.И.[1]

[1] Институт химической биологии и фундаментальной медицины, 630090, пр. Лаврентьева, 8, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский институт органической химии, 630090, пр. Лаврентьева, 9, Новосибирск им. Н.Н.Ворожцова, Россия
[3] Институт цитологии и генетики, 630090, пр. Лаврентьева, 10, Новосибирск, Россия
E-mail: a.zakharenko73@gmail.com

Фермент репарации ДНК тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) в последнее десятилетие рассматривается как перспективная мишень для сопровождающей терапии онкологических заболеваний. Традиционная противораковая химиотерапия имеет целью повреждение ДНК опухолевых клеток, и эффективность лечения зависит в том числе от эффективности систем репарации ДНК. Tdp1 играет ключевую роль в удалении повреждений ДНК, вызванных противораковыми лекарствами, в частности топотеканом [1], поэтому совместное использование ингибиторов Tdp1 и противораковых препаратов может значительно увеличить эффективность последних [2].

Исследование посвящено изучению способности производных природных биологически активных соединений – ингибиторов Tdp1 – сенсибилизировать противоопухолевое действие топотекана.

Среди производных биологически активных веществ обнаружены эффективные ингибиторы Tdp1, в том числе наиболее эффективные ингибиторы этого фермента, известные на сегодняшний день, гидразонотиазольные производные усниновой кислоты. Многие из этих соединений не токсичны в отношении перевиваемых клеточных линий, что важно с точки зрения дополнительных побочных эффектов терапии. Некоторые из изученных соединений усиливали цитотоксический эффект топотекана на различных типах перевиваемых клеток и противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана на мышиных моделях онкологических заболеваний.

Показана хорошая переносимость ингибиторов Tdp1 (отсутствие значимых изменений веса, органных индексов, поведения экспериментальных животных).

Изучена фармакокинетика в крови мышей соединения – лидера енаминового производного УК, показано, что при совмещении пиков концентраций топотекана и производного УК эффективность комбинированной терапии существенно возрастает.

Показано, что применение ингибиторов Tdp1 приводит к нормализации кроветворения у мышей с карциномой Кребс-2 или карциномой легких Льюис.

Литература
1. Comeaux E.Q., Waardenburg R.C. *Drug Metab. Rev*., 2014, **46**, 494-507.
2. Zakharenko A., Dyrkheeva N., Lavrik O. *Med. Res. Rev*., 2019, **39**, 1427-1441.

Исследование поддержано грантом РНФ № 21-14-00105

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С ПОВЕРХНОСТЬЮ ГКР-АКТИВНОЙ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ ЗОЛОТОЙ ПОДЛОЖКИ

Звягина Ю.Ю.,[а] Богинская И.А.,[а] Седова М.В.,[а] Афанасьев К.Н.,[а] Рыжиков И.А.[а,б]

[а] ИТПЭ РАН, 125412, Москва, Ижорская 13 стр.6,
e-mail: jul-zvyagina@inbox.ru
[б] НОЦ ФМН – МГТУ им. Н.Э. Баумана, 105082, Москва, Рубцовская наб, 2/18

Эффект гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) широко используется для детектирования аналитов различной природы в малых концентрациях, что делает его практическое применение актуальным при создании биосенсоров, позволяющих проводить медицинские и биохимические анализы окружающей среды и пищевых продуктов[1], определять различные биологические объекты, такие как белки, нуклеиновые кислоты[2], вирусы и бактерии[3]. Одним из наиболее перспективных направлений является количественное и качественное определение белковых соединений, которые являются маркерами различных заболеваний. Для точного, воспроизводимого и интерпретируемого анализа важно правильно подобрать материал и параметры подложки, реализующей эффект ГКР и являющейся основой биосенсора. Основными материалами, позволяющими реализовать ГКР эффект, являются благородные металлы, такие как серебро, золото и медь[4].

Одним из ключевых факторов, определяющим интенсивность ГКР сигнала на ГКР –активных подложках с оптимальными параметрами морфологии, является взаимодействие между аналитом и поверхностью подложки, так как именно оно обеспечивает физико-химический контакт аналита с поверхностью подложки, что, в свою очередь, определяет интенсивность ГКР сигнала исследуемого объекта.

Целью данной работы является исследование факторов, определяющих оптимальный физико-химический контакт белкового аналита на примере человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), осаждаемого на наноструктурированных золотых подложках, полученных методом электронно-лучевого испарения.

В работе был проведен анализ времени высыхания капель водного раствора ЧСА в малых концентрациях (менее 1 мкг/мл) на ГКР-активных подложках. Обнаружена характерная зависимость увеличения времени высыхания капель одинакового объема с уменьшением концентрации аналита. Предложен механизм гидратации ЧСА в водных растворах при малых концентрациях, позволяющий объяснить увеличение времени высыхания капель. Выполнены оценочные расчеты количества молекул ЧСА в водных растворах различных концентраций. Исследованы зависимости вида (соотношения полос колебаний и их амплитуды) ГКР спектров от параметров пробоподготовки раствора ЧСА.

Литература
[1] Szaniawska A. and Kudelski A. Front. Chem., 2021, **9**
[2] Long W. et al. Current Opinion in Biomedical Engineering, 2019, **13**
[3] M. Rai et al. (eds.), Macro, Micro, and Nano-Biosensors, Springer Nature Switzerland AG, 2021
[4] Pamela A. Mosier-Boss, Nanomaterials, 2017, **7**, 142

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ БИОКОНВЕРСИИ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Зоров И.Н.[1,2], Рожкова А.М.[1,2], Синицына О.А.[1], Телицин В.Д.[1], Короткова О.Г.[2], Рубцова Е.А.[2], Кондратьева Е.Г.[2], Семёнова М.В.[2], Доценко А.С.[2], Осипов Д.О.[2], Денисенко Ю.А.[2], Синельников И.Г.[2], Кислицин В.Ю.[2], Чулкин А.М.[2], Савинова О.С.[2], Шашков И.А.[2], Сатрутдинов А.Д.[2], Синицын А.П.[1,2]

[1]Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Ленинские горы, 1-11Б
[2]ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Ленинский пр-т, 33-2
inzorov@mail.ru

Современный мир сталкивается с рядом ключевых вызовов, среди которых переход от общества, основанного на ископаемых ресурсах, к более устойчивому обществу с растущим вкладом возобновляемых источников энергии и материалов. В настоящее время использование возобновляемого сырья, такого как побочные продукты сельского и лесного хозяйства, приобретает все большее значение в качестве исходного материала для будущих биотехнологических продуктов. Природные полисахаридные субстраты, такие как лигноцеллюлоза или крахмал, сначала преобразуются в сахара, которые впоследствии путем ферментации превращаются в широкий спектр продуктов, включая органические кислоты и растворители, биопластики, биотоплива, аминокислоты, фармацевтические препараты.

Стратегия достижения результатов включает в себя региональное конкурентоспособное сырье из биомассы, рациональный процесс предварительной обработки (физический, химический или их сочетание), а также разработку штаммов и оптимизацию условий ферментации. Этап предварительной обработки должен эффективно повышать реакционную способность выбранной биомассы, создавая при этом минимальное количество токсичных примесей для последующих этапов процесса, а также для окружающей среды. Тонкий помол, органосольв, щелочная обработка и ионные жидкости представляются перспективными с точки зрения эффективности при относительно низкой стоимости и низкого воздействия на окружающую среду. Эти методы предварительной обработки снижают содержание лигнина и значительно улучшают реакционную способность целлюлозы на этапе ферментативного гидролиза.

Мицелиальный гриб *Penicillium verruculosum* производит комплекс высокоактивных ферментов для деградации предварительно обработанного лигноцеллюлозного сырья, такого как солома, багасса, щепа и отходы производства бумаги. Комплекс ферментов, выделяемых вышеуказанным грибом, содержит экзо- и эндо-целлюлазы (целлобиогидролазы (ЦБГ) и эндоглюканазы (ЭГ)) и бета-глюкозидазу (β-Г), ксиланазы, а также литические полисахаридные монооксигеназы (ЛПМО). Подбор состава ферментного комплекса в зависимости от состава и свойств полисахаридного субстрата играет важную роль в оптимизации процесса ферментативного осахаривания.

Недавно был выделен и описан новый ЛПМО - важный компонент мультиферментного целлюлазного комплекса, секретируемого грибом *P. verruculosum*. ЛПМО является усилителем гидролитической функции ферментного целлюлолитического комплекса, поскольку осуществляет окислительную деполимеризацию целлюлозы, действуя либо на -C1, либо на -C4 атом остатка ангидроглюкозы полимерной цепи целлюлозы.

Рекомбинантные штаммы-продуценты гомологичной ЛПМО и гетерологичной β-глюкозидазы из *Aspergillus niger* (β-ГAn) были получены на основе гриба-хозяина *P. verruculosum* 537 (DniaD) с использованием комплекса генно-инженерных подходов. Выделение и определение состава ферментов в культуральной жидкости, секретируемых новым рекомбинантным штаммом *Penicillium verruculosum* β-Г-ЛПМО, было проведено методом FPLC. Содержание компонентов показало наличие 47% ЦБГI, 13% ЭГ, 18% β-ГAn и 2% ЛПМО вместо 56% ЦБГI, 10% ЭГ, 3% BG и <1% ЛПМО у штамма-хозяина *P. verruculosum* 537. Эксперименты по осахариванию проводились с измельченной древесиной осины как наиболее популярного в России древесного сырья. Конверсия субстрата составила 35% в случае применения β-Г-ЛПМО и 25% при использовании ферментного препарата на основе штамма-хозяина в качестве контроля. Таким образом, полученный в данной работе новый целлюлазный препарат, содержащий LPMO, открывает широкие перспективы для дальнейшей оптимизации мультиферментных коктейлей для осахаривания лигноцеллюлозных материалов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение 075-15-2022-1226 от 17.10.2022).

МОНИТОРИНГ АКТИВНОСТИ ЕДИНИЧНЫХ МОЛЕКУЛ ФЕРМЕНТОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ НА ПРИМЕРЕ ИССЛЕДОВАНИИ ПЕРОКСИДАЗЫ

Иванова И.А., Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О., Арчаков А.И.

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8,
e-mail: i.a.ivanova@bk.ru

Традиционно информацию о кинетике ферментативных процессов получают с помощью классических биохимических методов, использующих регистрацию сигнала от большого ансамбля молекул. Как правило, отслеживаются изменения концентрации каких-либо компонентов ферментативной системы с течением времени. В настоящей работе предлагается принципиально новый метод исследования системы ферментов с применением молекулярного детектора – атомно-силового микроскопа (АСМ). Новизна подхода заключается в регистрации сигнала в процессе ферментной активности непосредственно от единичных биомакромолекул, а не от ансамбля.

АСМ позволяет визуализировать единичные молекулы с субмолекулярным пространственным разрешением и со скоростью порядка 100 мс [1], а также наблюдать перестройки единичных ферментов, которые могут маскироваться в экспериментах с усреднением по большому количеству объектов [2].

Ранее в ИБМХ был предложен подход [3] позволяющий проводить покадровое АСМ-наблюдение изменений флуктуаций высот единичных молекул фермента, однако инструментальная составляющая не позволяла на тот момент визуализировать одну и ту же молекулу на всех стадиях ферментативного цикла. В настоящей работе, с целью развития предложенного подхода отрабатываются методики АСМ-визуализации одной и той же молекулы фермента в течении длительного времени, что позволит в преспективе отслеживать изменения в ее конформации на протяжении всего цикла. В качестве модельного объекта выбран доступный и хорошо охарактеризованный гемсодержащий фермент - пероксидаза хрена (ПХ). Подобраны условия для АСМ-визуализации ПХ в жидкости, при которых молекулы адсорбируются на поверхность преимущественно (96,2%) в мономерной форме. Выполнен сравнительный анализ агрегатного состояния молекул ПХ при сканировании в жидкости и в воздухе. Рассчитаны параметры дрейфа системы, влияющие на смещение визуализированных молекул при покадровой съемке. Полученные данные будут использоваться для дальнейшего мониторинга активности ферментов в процессе функционального цикла.

Литература
1. Ando T. High-speed AFM imaging //Current opinion in structural biology. – 2014. – Т. 28. – С. 63-68.
2. Xie X. S., Lu H. P. Single-molecule enzymology //Journal of Biological Chemistry. – 1999. – Т. 274. – №. 23. – С. 15967-15970.
3. Иванов Ю. Д. и др. АСМ-визуализация, измерение активности и физико-химических свойств единичных мономер ов и олигомеров ферментов //Биофизика. – 2011. – Т. 56. – №. 5. – С. 939-944.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№122030100168-2).

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ФЕРМЕНТОВ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ ДНК НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ УДАЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ

Кладова О.А., Алексеева И.В., Тюгашев Т.Е., Микушина Е.С., Кузнецов Н.А., Кузнецова А.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского Отделения Российской Академии Наук, 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева 8, e-mail: kladova@niboch.nsc.ru

Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) широко распространены в популяции людей. Взаимосвязь между SNP и этиологией некоторых заболеваний человека остается открытой областью исследований, одним из актуальных вопросов которой является выяснение роли SNP в генах, кодирующих ферменты репарации, в предрасположенности к развитию онкологических и нейродегенеративных заболеваний. В настоящей работе был проведен систематический анализ природных полиморфных вариантов ключевых ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК: урацил-ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4, АР-эндонуклеазы APE1 и ДНК-полимеразы β человека. С использованием базы данных dbSNP NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/) было установлено, что в генах данных ферментов зарегистрированы тысячи SNP (например, ген ДНК-полимеразы β содержит более 8000 SNP). Методами биоинформационного анализа показано, что некоторые из них могут оказывать влияние на эффективность действия ферментов. Был проведен экспериментальный анализ 26 природных вариантов SMUG1, MBD4, APE1 и Polβ, который выявил существенное влияние отобранных природных замен как на каталитическую активность ферментов, так и на их координацию с другими участниками процесса репарации.

В рамах работы был проведен анализ 11 полиморфных вариантов Polβ (L19P, G66R, G118V, R149I, E154A, G189D, M236T, R254I, G274R, G290C, R333W) для которых было предсказано негативное влияние на функционирование фермента. Активность рекомбинантных препаратов ферментов была проверена с использованием ДНК-субстрата, содержащего специфичное для Polβ повреждение – однонуклеотидную брешь. Анализ активности показал, что все проанализированные полиморфные варианты переносят остаток dNMP с меньшей эффективностью, чем WT Polβ, причем замены G274R и R333W приводили к существенной инактивации трансферазной активности. При определении влияния полиморфных вариантов на стадию связывания с ДНК и dNTP было показано, что возникновение отдельных мутаций во всех доменах фермента может приводить к снижению аффинности к этим субстратам. При этом, мутации G189D и G274R незначительно увеличивали значение константы диссоциации K_d (примерно в 1,5 раза), но приводили к увеличению значения наблюдаемой константы диссоциации $K_{d,\ app\ (dNTP)}$ почти на один порядок. При изучении влияния полиморфных вариантов на каталитическую стадию было обнаружено, что часть мутаций не приводит к уменьшению значения константы полимеризации k_{pol} (R149I, E154A, M236T, R254I, G290C), при этом общая эффективность переноса остатков dNMP была ниже, чем для фермента дикого типа. Таким образом, возникновение природных мутаций в ферменте может влиять на различные стадии ферментативного процесса, тем самым оказывая влияние на эффективность репарации в организме.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 21-74-10103.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ ИНАКТИВАЦИИ ЦЕФАЛОСПОРИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ МЕТАЛЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Кривицкая А.В.,[а] **Хренова М.Г.**[а,б]

[а]*ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2, al_krivickaya@mail.ru*
[б]*МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, г. Москва, Ленинские Горы, 1, стр.3.*

β-лактамные антибиотики являются наиболее многочисленной группой антибактериальных средств. Резистентность к β-лактамным антибиотикам в первую очередь связана с экспрессией бактериальных ферментов β-лактамаз. Проблема антибиотикорезистентности является нетривиальной многокомпонентной задачей. Для решения данной задачи задействованы специалисты из различных областей и применяется широкий спектр научных методов исследования, в том числе молекулярное моделирование. Современные методы многомасштабного молекулярного моделирования способны описать молекулярный механизм реакции в активном центре фермента. Понимание молекулярного механизма в первую очередь дополняет фундаментальные знания о исследуемом процессе, но также может применяться для разработки новых антибактериальных средств. Для достижения этих целей используется квантово-механическое описание активного центра фермента.

В данной работе методом молекулярного моделирования квантовой-механики/молекулярно-механики получены структуры переходного состояния лимитирующей стадии реакции гидролиза набора антибиотиков цефалоспориновго ряда в активном центре металло-β-лактамазы L1. Квантово-топологический анализ электронной плотности активного центра позволил выявить ключевое межатомное взаимодействие, лимитирующее скорость реакции гидролиза антибиотиков. Построено уравнение, связывающее микроскопические параметры электронной плотности системы с такими макроскопическими параметрами, как каталитическая константа скорости реакции — k_{cat}. Полученное уравнение структура-свойство позволило предложить потенциальную структуру антибиотиков, гидролизующихся значительно медленнее, чем использующиеся в практике на данный момент.

МОДУЛЯЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛИПАЗЫ В ПРОЦЕССАХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СИНТЕЗА СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ПУТЕМ ВЫБОРА НОСИТЕЛЯ-АДСОРБЕНТА

Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б.

Институт катализа СО РАН, 63090 Новосибирск, Россия, пр. Акад. Лаврентьева, 5

Биокатализаторы (БК) с активностью липазы были приготовлены путем адсорбционной иммобилизации рекомбинантной липазы (обознач. r*Pichia*/lip) из *Thermomyces lanuginosus,* продуцируемой генно-инженерным штаммом метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris.* В качестве адсорбентов использовали различные по физико-химическим свойствам носители: мезопористый гидрофильный силикагель (SiO_2), макропористый гидрофобный аэрогель (МУА) и композитные углерод-силикатные материалы (КУСМ). Ферментативная активность, субстратная специфичность и операционная стабильность приготовленных БК были исследованы в реакции этерификации насыщенных монокарбоновых (жирных) кислот и алифатических спиртов с различным количеством атомов углерода в молекуле (C_2–C_{18}). Были составлены матрицы и/или диаграммы субстратной специфичности для 60 пар субстратов (кислоты и спирта) путем сравнения скоростей реакции этерификации в полностью идентичных условиях, что позволило выявить различия в свойствах БК в зависимости от химической природы носителя. Было обнаружено, что всех БК максимальная скорость реакции наблюдалась при этерификации гептановой кислоты (C_7) бутиловым спиртом (C_4). В одинаковых условиях синтеза бутил гептаноата r*Pichia*/lip, адсорбированная на силикагеле, проявляла на порядок меньшую активность, чем липаза, адсорбированная на углеродном аэрогеле. Каталитические константы, равные 3.7 $с^{-1}$ и $1.1 \cdot 10^2$ $с^{-1}$ соответственно, различались в 30 раз. Было обнаружено, что этиловые эфиры короткоцепочечных C_4–C_7 жирных кислот синтезируются с 2–3 раза быстрее с участием биокатализатора «r*Pichia*/lip на МУА». В то же время, эфиры высокомолекулярных C_9, C_{10}, C_{18} кислот и C_8–C_{16} спиртов синтезируются в 1.5–2 раза быстрее с участием «r*Pichia*/lip на SiO_2», несмотря на гидрофильные свойства данного БК и выраженную гидрофобность субстратов. Операционная стабильность приготовленных БК была достаточно высокой: биокатализаторы сохраняли до 100% первоначальной активности после проведения 30-ти реакционных циклов продолжительностью 4–6 ч до достижения конверсии кислоты не менее 85%.

БАКТЕРИИ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* КАК БИОКАТАЛИЗАТОР В АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРАХ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ

Козлова Т.Н., Юдина Н.Ю., Богачихин Д.А.

Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии, НИЦ «БиоХимТех»,
ФГБОУ ВО Тульский государственный университет,
300012, Тула, ул. Фридриха Энгельса, 157,
e-mail: kozlovatatyana_1993@mail.ru

Оперативный мониторинг токсичных соединений в объектах окружающей среды имеет важное значение для сохранения здоровья населения. В настоящее время активно ведутся исследования по разработке простых, экспрессных и экономически эффективных биосенсоров для определения интегральной токсичности.

Режим работы биосенсора и используемые типы электродных материалов могут влиять на токсическую реакцию биочувствительного элемента сенсора. Поэтому целью данной работы является сравнение токсического влияния органических веществ и ионов тяжелых металлов на окислительную активность бактерий *Lactobacillus acidophilus* в составе биосенсоров на основе кислородного электрода и медиаторного типа.

Измерения проводили на кислородном электроде Кларка в сочетании с анализатором «ЭКСПЕРТ-009» в режиме «термооксиметр» и графитово-пастовом электроде с ферроценом с использованием потенциостата Corrtest CS350. Бактерии *L. acidophilus* фиксировались на электродах с помощью диализной мембраны. При последовательном внесении в измерительную кювету с K,Na-фосфатным буфером (pH 6,0) токсиканта и глюкозы (концентрация в кювете 5 ммоль/л) устанавливали снижение окислительной активности бактерий. По полученным данным определяли концентрацию токсиканта, вызывающую 50 % ингибирование, как EC_{50} (табл. 1).

Таблица 1. Значения EC_{50} для биосенсоров разных типов на основе *L. acidophilus*

Токсикант / Тип биосенсора	Значения EC_{50}, мг/л		
	Биосенсор на основе кислородного электрода (*L. acidophilus)*	Биосенсор медиаторного типа (*L. acidophilus)*	Аналог «Биотокс-10М» (биопрепарат «Эколюм»)
Трихлоруксусная кислота (ТХУ)	>200	4,3	0,4
1,2-дихлорэтан	>200	5,0	1,6
Цинк (II)	>200	2,9	27
Хром (III)	>200	0,9	17

Бактерии *L. acidophilus*, иммобилизованные на кислородном электроде, показали высокую устойчивость к выбранным токсикантам. Биосенсор медиаторного типа на основе бактерий *L. acidophilus* сопоставим с коммерческой тест-системой «Биотокс-10М» по чувствительности к ТХУ и 1,2-дихлорэтану и превосходит аналог по чувствительности к ионам Zn^{2+} и Cr^{3+}, что позволяет использовать его для оценки интегральной токсичности.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

НАНОЗИМЫ «ИСКУССТВЕННАЯ ПЕРОКСИДАЗА» НА ОСНОВЕ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ: ОТ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ДО СЕНСОРНЫХ ПРИЛОЖЕНИЙ

Комкова М.А., Карякин А.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва
e-mail: mkomkovama@my.msu.ru

Одной из актуальных задач является создание «искусственной пероксидазы» (наиболее используемого фермента), сочетающей высокую каталитическую активность со стабильностью в широком диапазоне условий. Несмотря на сообщаемую в литературе пероксидазную активность различных неорганических наночастиц (НЧ), их применение на практике ограничено низкой селективностью и активностью в физиологических pH. Для преодоления перечисленных недостатков предложен каталитический синтез «искусственной пероксидазы» на основе наилучшего электрокатализатора восстановления H_2O_2 – берлинской лазури (БЛ) [1].

Каталитически синтезированные НЧ БЛ обладают характеристиками, присущими природным пероксидазам: высокими специфичностью и каталитической активностью в реакции восстановления H_2O_2 в нейтральных pH [1]. В отличие от пероксидаз, которые сначала взаимодействует с H_2O_2, в случае нанозимов в реакцию вступает комплекс БЛ с донором электронов. Установлено, что скорость-лимитирующей стадией является необратимая бимолекулярная реакция взаимодействия комплекса нанозима и восстанавливающего субстрата с H_2O_2. Константа скорости для этой стадии k_2 для наиболее «быстрых» субстратов, пирогаллола и ферроцианида, в 100 раз превосходит таковую для пероксидаз ($k_2 \approx (1\text{-}2)\cdot 10^8$ $M^{-1}c^{-1}$) [2]. Такие высокие скорости объясняются большим числом активных центров на поверхности НЧ БЛ и их равнодоступностью.

Ультравысокая активность и стабильность «искусственной пероксидазы» делает возможным ее применение в качестве более надежного и совершенного аналога природного фермента. Так, соиммобилизация оксидаз с НЧ БЛ позволяет создать биосенсор типа энзим-нанозим с рекордными чувствительностью и операционной стабильностью [3]. Помимо этого, НЧ могут быть использованы в качестве универсальных электрокаталитических меток для ДНК-сенсоров [4]. Функционирование (био)сенсорных систем на основе БЛ в режиме генерации мощности позволяет не только отказаться от использования потенциостатических схем в пользу амперметра, но и обеспечивает более точное и правильное определение концентрации за счет увеличения соотношения сигнал/шум на порядок. Рекордные аналитические характеристики (био)сенсоров на основе покрытий и НЧ БЛ, а также возможность работы в режиме генерации мощности открывают широкие перспективы создания носимых электроаналитических устройств для неинвазивной диагностики [5].

Литература
1. Komkova M.A., Karyakina E.E., Karyakin A.A. // JACS, 2018, 140, 11302.
2. Komkova M.A., … , Karyakina E.E., Karyakin A.A. // J. Phy.Chem.Letters, 2021, 12, 171.
3. Komkova M.A., Andreeva K.D., ..., Karyakin A.A. // ChemElectroChem, 2021, 8(6), 1117.
4. Komkova M.A., Shavokshina V.A., ... , Zatsepin T.S., Karyakin, A.A. // Talanta, 2023, 124337.
5. Komkova M.A., …, Eliseev An.A. Karyakin A.A. // Biosensors and Bioelectronics, 2022, 202, 113970.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, грант # 21-73-10123.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРЕЙЗИНГА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Копнова Т.Ю., Копнов А.Ю., Якупова Л.Р., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В., Аржакова Е.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119991, Россия, г. Москва ул. Ленинские Горы, д. 1
kopnovataty@gmail.com

Внедрение биологически активных молекул (БАМ) в полимер является довольно трудной задачей из-за термодинамической несовместимости компонентов, а также довольно жестких условий проведения инкорпорации, что может приводить к существенному снижению эффективности таких систем. Крейзинг полимеров позволяет получать мезопористые полимерные матрицы на основе широкого спектра полимеров, в том числе полиэтилена высокой плотности (ПЭВП) и полиэтилентерефталата (ПЭТФ), широко используемых в современной промышленности. В полученную матрицу могут быть введены различные компоненты, в т. ч. и антибактериальные молекулы. Данный процесс не требует использования токсичных растворителей и высоких температур, в результате которых активность БАМ может быть снижена. Были исследованы материалы, полученные на основе пленок ПЭВП и волокон ПЭТФ. Для получения мезопористых матриц пленки ПЭВП были деформированы в эмульсии гептан/вода на 200% и стабилизированы отжигом в изометрических условиях. Объемная пористость материала составляет около ~40%, размеры пор 15-20 нм. Волокна ПЭФТ были деформированы на семиточечном изгибном устройстве для получения системы с высокой плотностью крейзов, после чего в результате растяжения в *н*-бутаноле на 100% была получена мезопористая структура. Антибактериальная добавка вводилась путем пассивного влажного импрегнирования в растворе левофлоксацина (ЛФ). Привес левофлоксацина был определен гравиметрически после высушивания образцов в эксикаторе ($\omega_{ЛФ/ПЭВП}$ = 0.8 ± 0.2 масс. %; $\omega_{ЛФ/ПЭТФ}$ = 7.0 ± 1.3 масс. %). Была изучена зависимость кинетики высвобождения ЛФ из материала. Методом равновесного диализа (PBS, pH 7.4, 37°C) показано, что в течение первых 45 минут высвобождается до 15% ЛФ и менее 30% в течение 7 дней. Быстрый релиз на начальном участке обусловлен диссоциацией ЛФ с поверхности ПЭВП, далее наблюдается медленное высвобождение из объема полимерной матрицы, таким образом можно говорить о пролонгированном выделении препарата. Для исследования эффективности антибактериального действия материала на твердую питательную среду с распределенной бактериальной культурой помещали ЛФ/ПЭВП пленки заданного размера. Полученные системы инкубировали при 37°C в течение 24 ч, после чего измеряли площадь зоны ингибирования роста бактерий (S_{inh}). Эффективность антибактериального материала (A) оценивалась как отношение S_{inh} к массе ЛФ в пленке. Для *Lactobacillusplantarum 8P-A3* A = 78±5 мм^2/мкг, а для *Escherichia coli ATCC 25922* A = 420±20 мм^2/мкг. Полученные результаты создают широкие возможности для создания широкого круга инновационных и высокоэффективных полимерных материалов биомедицинского назначения с высокими антибактериальными свойствами.

Работа выполнена в рамках реализации гранта РНФ 22-24-00604, при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2020-794) с использованием оборудования (ИК-Фурье-спектрометр Bruker Tensor 27, и КД-спектрометра) по программе развития МГУ.

ГИБРИДНЫЕ ЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ФОСФАТА КАЛЬЦИЯ И ХИТОЗАНА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НОСИТЕЛИ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Кост О.А.[1], Попова Е.В.[1], Тихомирова В.Е.[1], Безнос О.В.[2], Чеснокова Н.Б.[2]

[1] Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Химический факультет Москва 119991
kost-o@mail.ru
[2] Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца Минздрава России, Москва 105162

Лечение заболеваний глаз обычно производят с помощью лекарственных средств в форме растворов. Однако из-за наличия барьера роговицы и смыва слезой степень проникновения препаратов в глаз крайне низка. Для увеличения эффективности проникновения препаратов в ткани глаза можно использовать инкапсулирование препарата в носители различной природы, в частности, кальций-фосфатные частицы (CaP-частицы). Однако роговица несет отрицательный заряд, а поверхность CaP-частиц также заряжена отрицательно, поэтому можно было полагать, что покрытие частиц катионным биоадгезивным хитозаном улучшит взаимодействие CaP-частиц с поверхностью глаза и усилит действие включенных препаратов. Для покрытия были использованы хитозаны двух видов – 5 кДа хитозан и 72 кДа гликоль-хитозан.

В качестве препаратов, включаемых в частицы, были выбраны низкомолекулярный ингибитор ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) эналаприлат и фермент супероксидредуктаза 1 (СОД1). Выбор препаратов обусловлен тем, что оба препарата обладают противовоспалительным и гипотензивным действием при их местном применении. Включение эналаприлата и СОД1 в CaP-частицы проводили на стадии их получения. В результате были получены гибридные частицы, содержащие эналаприлат и характеризующиеся средним гидродинамическим диаметром 180±30 нм и 260±30 нм, а также ζ-потенциалом +7±3 мВ и +16±3 мВ при использовании 5 кДа хитозана и гликоль-хитозана, соответственно. Гибридные частицы, содержащие СОД1 и покрытые 5 кДа хитозаном, характеризовались средним гидродинамическим диаметром 170 ± 20 нм и ζ-потенциалом +22 ±1 мВ.

Показано, что включение как эналаприлата, так и СОД1, в гибридные частицы привело к замедленному высвобождению препаратов из частиц. Кроме того, продемонстрировано более эффективное удерживание препаратов в составе частиц, чем в виде водного раствора, в слезной жидкости кроликов при однократной инстилляции.

Фармакологическое действие препаратов оценивали по их способности снижать внутриглазное давление (ВГД) у нормотензивных кроликов. Показано, что включение препаратов в гибридные частицы вызывало значительно более глубокое и пролонгированное снижение ВГД при однократной инстилляции по сравнению с водными растворами препаратов. Сравнение эффективности действия эналаприлата в составе гибридных частиц, CaP-частиц и хитозановых частиц продемонстрировало преимущество гибридных частиц как перспективных носителей офтальмологического препарата.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕМОВЫХ ПЕРОКСИДАЗ ПОЗВОНОЧНЫХ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ ПРИ ПОМОЩИ СЕНСОРОВ СЕМЕЙСТВА HYPOCRATES

Костюк А.И.,[а,б,в] Tossounian M.-A.,[г] Раевский Р.И.,[а] Янушкевич С.В.,[д] Сергеева А.Д.,[а,е] Панова А.С.,[а,б,в] Храмова Ю.В.,[а,е] Чебаненко В.В.,[а,е] Заболотский А.И.,[а,е] Катруха В.А.,[а,е] Баранов М.С.,[а] Messens J.,[г] Белоусов В.В.,[а,б,в,ж] Билан Д.С.[а,б,в]

[а]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, 117997, Москва, Миклухо-Маклая 16/10
alexander.kostyuk@inbox.ru
[б]Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 117997, Москва, Островитянова 1
[в]Лаборатория экспериментальной онкологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 117997, Москва, Островитянова 1
[г]VIB-VUB Center for Structural Biology, Брюссель, Бельгия
[д]Ягеллонский Университет, Факультет Биохимии, Биофизики и Биотехнологии, Краков, Польша
[е]Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы 1
[ж]Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, 117513, Москва, Островитянова 1, стр. 10

Гемовые пероксидазы позвоночных представляют собой специализированную группу ферментов, основная биологическая функция которых заключается в синтезе (псевдо)гипогалогенных кислот. Данные соединения (HOCl, HOBr, HOSCN) являются активными электрофилами и модифицируют такие биологические соединения как белки, нуклеиновые кислоты и липиды. В конечном итоге, подобные химические перестройки приводят к нарушению нормального функционирования клеток, вызывают апоптотические или же некротические сценарии смерти, тем самым способствуя развитию воспалительных процессов. За последние десятилетия в литературе был накоплен огромный массив экспериментальных данных, убедительно свидетельствующих о том, что многие хронические заболевания человека сопровождаются галогенирующим стрессом. Однако, наши представления о том, какую именно роль (псевдо)гипогалогенные кислоты играют в развитии обсуждаемых явлений, остаются крайне фрагментарными. Во многом это связано с тем, что традиционные аналитические методы по их детекции зачастую обладают недостаточной чувствительностью и неудовлетворительным пространственно-временным разрешением.

Ранее мы разработали принципиально новый подход, позволяющий визуализировать галогенирующую активность гемовых пероксидаз в живых системах. Он основан на использовании генетически кодируемого сенсора Hypocrates, полученного путем интеграции cpYFP в гипохлорит-чувствительный транскрипционный фактор NemR. Hypocrates демонстрирует рациометрический обратимый ответ, относительно высокую селективность, а также характеризуется оптимальными кинетическими свойствами. Разработанный подход позволил нам визуализировать галогенирующий стресс как в цитоплазме живых бактерий, оказавшихся в фагосоме нейтрофила, так и в области механической раны мальков *Danio rerio*.

В рамках текущей работы нами были получены новые версии Hypocrates с оптимизированными параметрами. В частности, нам удалось значительно увеличить амплитуду ответа сенсора (с 2-ух до 8-ми раз), а также в значительной мере снизить pH-чувствительность белка, что позволяет минимизировать возможные артефакты измерений. Кроме того, нами была получена панель конструкций для локализованной экспрессии сенсоров семейства Hypocrates в основных органеллах клетки, которая открывает возможность для исследования субклеточной динамики (псевдо)гипогалогенных кислот. Наконец, усовершенствованные индикаторы были использованы для оценки эффектов распространенных редокс-активных агентов и модуляторов сигнальных путей на взаимодействие бактерий и нейтрофилов человека.

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*: КРИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР СУЩЕСТВУЮЩИХ МЕТОДОВ

Крылов А.А.

АО «НИИ Аджиномото-Генетика»,
117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1, корп. 1,
e-mail: Alex_Krylov@agri.ru

Corynebacterium glutamicum является одной из хорошо известных бактериальных платформ с долгой историей успешного применения в биотехнологии (производство L-Lys, L-Glu и т. д.) и хорошим потенциалом для будущего использования, включая исследования, связанные с медициной. Стоит отметить, что потенциал этой бактерии во многом определяется тем, что, несмотря на относительно близкое родство с человеческими патогенами, такими как *Corynebacterium diphtheria*, *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium leprae*, *C. glutamicum* имеет статус безопасного организма (Generally Recognized as Safe, GRAS).

На сегодняшний день существует множество методов редактирования генома *C. glutamicum*. Однако, по-прежнему существует разрыв в их количестве и эффективности по сравнению методами, разработанными для *E. coli*. Чтобы эффективно работать с известным набором методов, полезно начать понимать, какие преимущества он дает именно вам для достижения конкретно вашей цели. Очевидно, что каждая разработанная методика имеет как преимущества, так и ограничения/недостатки, которые обычно широко не обсуждаются в оригинальных статьях. Таким образом, разумный критический обзор опубликованных подходов в контексте их практического применения был бы полезен, особенно для молодых учёных.

Определим генетические методы, которые составляют «инструментарий для редактирования генома», как те, которые позволяют прецизионно модифицировать ДНК *in vivo* в конкретном месте (включая методы, основанные на RecA-зависимой гомологичной рекомбинации, RecA-независимой гомологичной рекомбинации (рекомбиниринг), сайт-специфической рекомбинации, CRISPR/Cas-связанные методы). Каждый из упомянутых методов редактирования генома будет рассмотрен с точки зрения рядовых исследовательских запросов, как то: максимальный размер вносимой модификации (например, точечный мутагенез гена или вставка/делеция целой экспрессионной единицы), затрачиваемый труд и время (определяет конечную скорость получения целевого мутантного штамма), а также эффективность (определяет общую стоимость создания целевого штамма-продуцента).

Мы надеемся, что представленный анализ опубликованных методик поможет молодым учёным выбрать наиболее рациональный способ селекции *Corynebacterium glutamicum*, а также других важных для биотехнологии бактерий.

НОВЫЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ L-АСПАРАГИНАЗЫ, ПРЕВОСХОДЯЩИЕ СУЩЕСТВУЮЩИЕ ПО ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОГЕМАТОЛОГИИ И СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Кудряшова Е.В., Добрякова Н.В.

МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия
E–mail: Helena_koudriachova@hotmail.com

Терапевтическое применение противоопухолевых ферментных препаратов, катализирующих деплецию определенных незаменимых аминокислот, основано на данных об отсутствии или низкой активности соответствующих синтетаз аминокислот в некоторых типах опухолевых клетках. Среди представителей этой группы ферментов L-аспарагиназы (АСП), L-лизин-альфа-оксидазы, метиониназы, аргининдезиминазы и др. L-аспарагиназы из *E. coli* (EcA) и *Erwinia chrysanthemi* (ErA) используются в первой линии стандартной терапии острого лимфобластного лейкоза, а также при лечении других видов опухолей: лимфогранулематоза, множественной миеломы и др. Однако, длительное терапевтическое применение белковых препаратов (в т.ч. из бактериальных источников) вызывает образование нейтрализующих антител и развитие иммунологической гиперчувствительности вплоть до анафилактического шока, из-за чего терапию часто приходится прекращать преждевременно. Повышение переносимости препаратов АСП путём повышения их эффективности (и понижения дозировки), а также снижения иммуногенности, могло бы способствовать более полной реализации их терапевтического потенциала.

Нами исследована серия препаратов АСП из различных источников, включая нативные и мутантные формы из *Erwinia carotovora* (EwA), *Rhodospirillum rubrum* (RrA), Wollinella succinogenes (WsA) и др. (EcA, ErA, HpA). Было найдено, что каталитическая активность препаратов АСП измеренная по аспарагину далеко не всегда коррелирует с их цитостатической активностью на культурах опухолевых клеток. Для многих препаратов воспроизводимо наблюдаются кратные отклонения по активности при измерениях на клеточных линиях от «ожидаемых» исходя из величины АСП ферментативной активности (в той же дозировке). Это невозможно объяснить различной чувствительностью раковых линий к деплеции аспарагина, потому что, будучи малочувствительна к одной АСП, та же клеточная линия может оказаться высокочувствительна к другой АСП в той же самой дозировке по МЕ ферментативной активности. Отсутствие явных закономерностей в отклонениях по цитостатической активности АСП на разных клеточных линиях может указывать на не до конца понятный, и, многофакторный механизм их цитостатического действия.

Нами показано, что кроме способности гидролизовать L-аспарагин, RrA способны интернализоваться в лейкозные клетки, что объясняет повышенную противоопухолевую активность фермента (по сравнению с ожидаемой исходя из активности по L-асп). Другие же изученные нами АСП не способны проникать внутрь исследованных клеток.

С другой стороны, нами было найдено, что некоторые из видов химической модификации АСП не только повышают их удельную ферментативную активность и стабильность в физиологических условиях, но также и делают их воспроизводимо более активными на клеточных линиях. С этой точки зрения, нами разработаны перспективные препараты из RrA. Мы обнаружили что при модификации RrA катионными разветвленными сополимерами хитозана и ПЭГ, и др наблюдается кратно более высокая антипролиферативная активность против всех имевшихся в нашем распоряжении клеточных линий и более высокая эффективность интернализации в опухолевые клетки. Активность на клеточных культурах возрастает кратно, в том числе, по сравнению с EcA и ErA, зарегистрированными в качестве фармацевтических препаратов в России и за рубежом. Полученные модифицированные АСП могут быть основой для создания новых противолейкозных препаратов с повышенной активностью и переносимостью.

Работа выполнена с использованием оборудования (ИК-Фурье-спектрометр Bruker Tensor 27 и Jasco J-815 CD Spectrometer) по программе развития МГУ.

МЕХАНИЗМЫ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ АПУРИНОВЫХ/АПИРИМИДИНОВЫХ ЭНДОНУКЛЕАЗ ИЗ РАЗНЫХ СТРУКТУРНЫХ СЕМЕЙСТВ

Кузнецов Н.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, проспект Лаврентьева 8
e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

Апуриновые/апиримидиновые (АР) эндонуклеазы играют одну из ключевых ролей в эксцизионной репарации оснований ДНК. Считается, что основной биологической функцией этих ферментов является гидролиз фосфодиэфирной связи с 5′-стороны от АР-сайтов, в результате которого образуется 5′-дезоксирибофосфат и 3′-ОН группа. Известно также, что эти ферменты могут узнавать в качестве субстратов не только АР-сайты, но и ряд поврежденных нуклеотидов, таких как 2′-дезокси-5,6-дигидроуридин, альфа-аномер 2′-дезоксиаденозина, 2′-дезокси-1,N6-этеноаденозин, 2′-дезоксиуридин и другие (NIR-активность). Кроме того, в число активностей некоторых АР-эндонуклеаз входят 3′-фосфодиэстеразная, 3′-5′-экзонуклеазная, 3′-фосфатазная и РНКазная.

Традиционно АР-эндонуклеазы разделяют на два больших семейства Exo III/Xth и Endo IV/Nfo, представленные экзонуклеазой III (Xth) и эндонуклеазой IV (Nfo) *Escherichia coli*, соответственно. В то время как члены семейства Xth широко представлены во всех доменах жизни, АР-эндонуклеазы семейства Nfo встречаются у низших организмов, но отсутствуют у растений, млекопитающих и других позвоночных. Кроме того, в 2015 году у представителя домена архей *Pyrococcus furiosus* была обнаружена новая ДНК-эндонуклеаза EndoQ, которая, предположительно, представляет собой фермент из нового класса АР-эндонуклеаз, структурно не связанного с двумя известными ранее.

Несмотря на большой интерес к выяснению механизмов распознавания нуклеотидов-мишеней АР-эндонуклеазами и природы контактов, которые определяют специфичность этих ферментов к широкому спектру различных поврежденных и неповрежденных нуклеотидов, вопрос о том, как конкретный нуклеотид распознается активным центром фермента, до сих пор оставался неясным.

В рамках данной работы проведено систематическое исследование молекулярно-кинетических механизмов узнавания повреждений и их удаления про- и эукариотическими АР-эндонуклеазами. Анализ конформационных перестроек АР-эндонуклеаз и их модельных ДНК-субстратов в процессах узнавания поврежденного нуклеотида, образования каталитического комплекса и катализа позволил предложить обобщенную модель узнавания повреждений, которая обеспечивает высокую субстратную специфичность данных ферментов. Эта модель включает несколько стадий: 1) изгиб и локальное раскручивание двойной спирали, 2) выворачивание поврежденного нуклеотида из ДНК в активный центр и 3) в случае EndoQ дополнительную верификацию поврежденного основания в активном центре путем образования специфических контактов. Таким образом, можно предположить, что способность поврежденного нуклеотида выворачиваться из двойной спирали и располагаться в активном центре фермента в ответ на образование контактов в ДНК-связывающем центре, по-видимому, является ключевым фактором, обеспечивающим субстратную специфичность АР-эндонуклеаз.

Работа поддержана грантом РНФ № 23-44-00064.

КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БЕЗМАТРИЧНОГО СИНТЕЗА ДНК, КАТАЛИЗИРУЕМОГО ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДИЛТРАНСФЕРАЗОЙ ЧЕЛОВЕКА TdT

Кузнецова А.А., Сенчурова С.И., Тюгашев Т.Е., Кузнецов Н.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8
e-mail: sandra-k@niboch.nsc.ru

ДНК-полимеразы принимают участие в различных клеточных процессах, связанных с репликацией и рекомбинацией ДНК, а также в процессах репарации и поддержания целостности нуклеиновых кислот. Различия биологических функций этих ферментов связаны с клеточной локализацией, специфичностью к определенным структурам ДНК-матрицы, точностью и процессивностью. В настоящее время известны многие детали функционирования ДНК-полимераз, связанные с особенностями образования каталитического комплекса, специфическим узнаванием праймера и dNTP и каталитическими стадиями присоединения нуклеотида к «растущей» цепи.

Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (TdT) принадлежит семейству X ДНК-полимераз, которое у человека включает еще три фермента: Pol β, Pol μ, Pol λ. Все четыре представителя ДНК-полимераз семейства X у человека вовлечены в репарацию и восстановление целостности ДНК. Необходимо отметить, что структура каталитического домена у всех ферментов имеет общую архитектуру. Однако в отличие от матрица-зависимых «gap-filling» ДНК-полимераз Pol β, Pol μ, Pol λ, фермент TdT катализирует добавление 2′-дезоксирибонуклеоз идтрифосфатов (dNTP) независимым от матрицы способом, преимущественно связывается с одноцепочечной ДНК и не приспособлен к копированию матричной цепи.

В ходе данной работы с использованием очищенного генно-инженерного препарата TdT установлено, что эффективность присоединения природных dNTP и скорость элонгации праймера зависят как от структуры азотистого основания, так и от иона-кофактора. Проведен детальный анализ особенностей образования фермент-субстратного комплекса и эффективности присоединения природных dNTP к ДНК-праймерам различного нуклеотидного состава и строения. Анализ конформационных превращений фермент-субстратных комплексов в процессах связывания ДНК-праймера и dNTP был проведен в режиме реального времени с помощью метода остановленного потока. Совокупность полученных данных позволила установить количественные характеристики механизма действия матрица-независимой ДНК-полимеразы, включающего процессы узнавания праймера и dNTP, образования каталитического комплекса, непосредственно каталитическую стадию присоединения нуклеотида к «растущей» цепи и последующую элонгацию/диссоциацию комплекса фермента с удлиненным праймером.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 21-64-00017.

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ПРОТООРИЗИН LAP ДЛЯ ГИДРОЛИЗА БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ

Середа А.С., Курбатова Е.И., Костылева Е.В., Цурикова Н.В.

ВНИИПБТ - филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, Россия, 111033, ул. Самокатная, 4б

Молочная сыворотка (МС) является ценным источником белков, сбалансированных по аминокислотному составу. В то же время, основные белки МС обладают иммуногенным действием, что ограничивает возможности их применения в пищевой промышленности. Обработка белков МС ферментными препаратами (ФП) эндопротеаз в сочетании с грибными пептидазами позволяет снизить антигенность сывороточных белков и повысить их питательную ценность.

На основе штамма *Aspergillus oryzae* 21-154 LAP нами был получен новый комплексный ФП Протооризин LAP, ключевыми компонентами которого являются лейцинаминопептидаза (LAP), кислая и щелочная эндопептидазы. По уровню общей протеолитической активности, определенной модифицированным методом Ансона при 30ºС, pH 7,2, Протооризин LAP был сопоставим с ФП Protamex (Novozymes A/S, Дания), а по активности LAP – с ФП Flavourzyme (Novozymes A/S, Дания).

Для определения эффективности Протооризина LAP при гидролизе белков МС 10%-ный раствор концентрата сывороточных белков (КСБ-80) гидролизовали при 50°С, pH 7,5 в течение 5 ч. Протооризин LAP и Flavourzyme дозировали из расчета 20 ед. LAP/г белка, Protamex использовали в дозировке 1% по отношению к массе белка. В полученных гидролизатах определяли остаточную антигенность методом ELISA и изменение белкового профиля на ДДС-электрофореграммах.

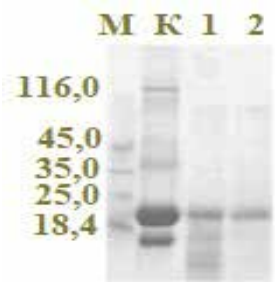


Рисунок 1. Электрофореграмма КСБ-80 и его гидролизатов: К – КСБ-80 без ФП, 1 – Protamex + Flavourzyme, 2 – Протооризин LAP

Ферментативный гидролиз обеспечил устранение высокомолекулярных форм β-лактоглобулина и значительное снижение количества его мономерной формы (18,3 кДа) (рис. 1). После комбинированной обработки ФП Protamex + Flavourzyme в гидролизате обнаруживались остаточные количества α-лактальбумина (14,2 кДа) и промежуточные продукты гидролиза. При использовании ФП Протооризин LAP на электрофореграмме заметны только остаточные количества β-лактоглобулина. В результате обработки КСБ-80 ФП Protamex + Flavourzyme антигенность субстрата была снижена в 113 раз, при использовании Протооризина LAP антигенность снизилась в 546 раз.

Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение Госзадания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2022–2024 годы (тема № FGMF-2022-0006)

ВКЛАД PARP 1 И PARP2 В ЭКСЦИЗИОННУЮ РЕПАРАЦИЮ ОСНОВАНИЙ В НУКЛЕОСОМЕ

Кутузов М.М., Белоусова Е.А., Кургина Т.А., Украинцев А.А., Васильева И.А., Ходырева С.Н., Лаврик О.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8
kutuzov.mm@mail.ru

Точная регуляция процессов репарации ДНК – один из ключевых элементов в обеспечении сохранности генетической информации. В числе систем репарации ДНК эксцизионная репарация оснований (BER) осуществляет исправление наиболее частого типа повреждений – которые не приводят к значительным искажениям структуры двойной спирали ДНК. Поэтому регуляция этой системы репарации представляет особый интерес. Одним из регуляторных механизмов в BER является поли(АДФ-рибозил)ирование (PARилирование) – перенос молекул поли(ADP-рибозы) на молекулы мишени. Реакция синтеза поли(ADP-рибозы) осуществляется белками семейства поли(ADP-рибоза)полимераз (PARP), из числа которых в регуляции репарации задействованы PARP1 и PARP2. Несмотря на многочисленные исследования, остаются вопросы, как BER регулируется PARP и как распределяются роли между PARP.

Следует отметить, что в живых клетках эукариот ДНК, как правило, упакована в хроматин, базовым элементом которого является нуклеосома – нуклеопротеидный комплекс, состоящий из восьми коровых гистонов и ДНК. Нуклеосомы являются структурной единицей хроматина, поэтому важно изучить, как может регулироваться процесс репарации в условиях компактизации ДНК.

В нашей работе мы исследовали влияние PARP1, PARP2 и PARилирования на активность основных ферментов BER, таких как APE1, ДНК-полимеразыβ (Polβ) и ДНК-лигазыIIIα (LigIIIα) в нуклеосомном контексте. В ходе работы были реконструированы модельные нуклеосомы (NCP) с повреждением ДНК, специфичном для процесса BER в заданном положении.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в большинстве случаев присутствие PARP1 приводит к подавлению активности APE1, Polβ и в меньшей степени LigIIIa. PARилирование PARP1 ослабляло этот эффект в различной степени в зависимости от фермента. PARP2 оказывала влияние преимущественно на последнюю стадию BER – лигирование разрыва в ДНК. Тем не менее, PARилирование PARP2 приводило к ингибированию Polβ и значительной стимуляции активности LigIIIα NAD^+-зависимым образом. На основе полученных и литературных данных мы предполагаем, что вклад в регуляцию BER посредством PARилирования на начальных стадиях преимущественно определяется PARP1, а на заключительных стадиях увеличивается вклад PARP2.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 22-74-10059.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ PGPR-БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS ДЛЯ УТИЛИЗАЦИИ ПАВ В СИСТЕМЕ РАСТИТЕЛЬНОГО МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА

Захаров Н.С., Лепикаш Р.В., Лаврова Д.Г.

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»,
300012, г. Тула, пр. Ленина, д. 92,
e-mail: d.g.fedoseeva@gmail.com

С ростом глобальных экологических проблем и истощением традиционных источников энергии возникает острая необходимость перехода на альтернативные источники энергии и более экологичные технологии, которые не оказывают неблагоприятного воздействия на экосистему. Биотопливные элементы на основе микроорганизмов (микробные топливные элементы, МТЭ) являются перспективной технологией для производства биоэлектроэнергии, так как позволяют одновременно решать проблемы загрязнения антропогенными органическими отходами, которые микроорганизмы могут использовать в качестве источника углерода и энергии. Для обеспечение бесперебойной генерации электричества в МТЭ требуется непрерывная и устойчивая подача органических субстратов, что не всегда можно реализовать на практике. Этот недостаток МТЭ в значительной степени устраняется технологией растительных микробных топливных элементов (РМТЭ), в которых выработка электроэнергии осуществляется путем окисления микроорганизмами органических веществ, как синтезируемых растениями в процессе фотосинтеза под действием энергии солнечного света и продуцируемых в окружающую среду (корневые экссудаты), так и поступающих извне, например, из сточных вод.

В РМТЭ водно-болотного типа для разработки биотехнологии одновременного получения «зеленой» энергии и очистки экосистем от ПАВ (на примере додецилсульфата натрия – ДДС) в качестве растительного компонента использовали макрофит *Lemna minor* (пресноводная ряска), характеризующийся фиторемедиационной способностью к различным классам загрязняющих веществ, что может дополнительно повысить эффективность очистки интегрированной системы. В качестве микробного компонента использовали ризосферные бактерии PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) группы *Pseudomonas chlororpahis OV 17* и *BS 1393*. Бактерии рода *Pseudomonas* являются эффективными деструкторами органических токсикантов, с другой стороны, способны к биосинтезу вторичных метаболитов – регуляторов роста растений и антимикробных соединений феназинового ряда, которые являются медиаторами внеклеточного переноса электронов.

Таблица 1. Характеристики функционирования РМТЭ в присутствии ДДС

Микроорганизмы	Электрическое напряжение, мВ	Степень утилизации ПАВ, %
Ps. chlororpahis OV 17	539 ± 3	99
Ps. chlororpahis BS 1393	680 ± 20	99

Полученные экспериментальные результаты доказывают, что РМТЭ на основе ряски и бактерий *Pseudomonas* являются эффективной системой одновременного получения «зеленой» энергии и очистки экосистем от ПАВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ МИКРОБНЫЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СИНТЕЗОВ

Лавров К.В., Новиков А.Д., Яненко А.С.

НИЦ "Курчатовский институт", Курчатовский Геномный центр,
117545, Москва, 1-Дорожный проезд,1,
e-mail: lavrov.ko@gmail.com

Органический синтез — это сборное название широчайшего спектра технологий получения органических соединений. Важным разделом таких технологий являются каталитические синтезы, в которых для ускорения получения органических соединений используются катализаторы - кислоты, основания, металлы и их оксиды, а также, в последнее время, ферменты. Последние, в силу специфики их получения и использования, формируют отдельный раздел органического синтеза, а именно биокаталитический синтез [1]. Одним из развивающихся видов таких синтезов является цельноклеточный биокатализ, в котором катализатором является фермент(ы), естественным образом включённый в состав клеток микроорганизмов, которые синтезировали эти ферменты в ходе своего развития. В цельноклеточном биокатализе обычно используются интактные, т.е. предварительно выращенные клетки, что отличает такие технологии от ферментации, в ходе которой синтез органических веществ сопряжён с усвоением питательных веществ и размножением клеток. Разнообразные микроорганизмы, на основе которых получают цельноклеточные биокатализаторы (БК), включают *E. coli, Aspergillus, Saccharomyces, Rhodococcus, Streptomyces, Acetobacter*, и многие другие. Микробными платформами принято называть те из них, для которых (1) развиты методы генетической инженерии, позволяющие быстро конструировать БК с нужными ферментными активностями, и (2) отработаны технологии выращивания клеток и использования их в промышленных условиях.

Наиболее известными микробными платформами сегодня являются грам-отрицательные бактерии *E. coli*, несовершенные и мицелиальные грибы *Saccharomyces, Aspergillus*, грам-положительные актинобактерии *Rhodococcus, Streptomyces*. Разработка биокаталитических технологий на основе этих микроорганизмов традиционно занимает важное место в научной работе Геномного Центра НИЦ «Курчатовский институт» (ГосНИИгенетика). В институте разработаны и продолжают совершенствоваться штаммы – биокатализаторы и соответствующие технологии для получения антибиотиков [2], аминокислот [3], акриловых мономеров [4], наночастиц [5], и биотоплива [6].

Литература
1. Яненко А. С. Биотехнология. - 2009. - №**2. – С. 3-13.**
2. Скляренко А.В. и др. Биотехнология. – 2022. - Т.38. - №**4. – С. 32-45.**
3. Дербиков Д.Д. и др. Биотехнология. – 2016. - Т.32. - №**5. – С. 38-48.**
4. Novikov et al. *Microbiology resource announcements*. – 2021. - Mar № **11**. 10(10).
5. Воейкова Т.А. и др. Российские нанотехнологии. - 2022. - Т. 17. - №**6. - С. 811-812.**
6. Yuzbasheva E.Y. et al. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2015. - № **175**, P. 3888–3900

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного Задания НИЦ «Курчатовский институт» (номер АААА-А20-120093090015-2 от 30.09.2020).

ДИЗАЙН КОМБИНИРОВАННЫХ ЛИПИДНО-ПОЛИМЕРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОЙ ДОСТАВКИ НЕСКОЛЬКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БОРЬБЫ С ТЯЖЕЛЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Ле-Дейген И.М., Мамаева П.В., Сафронова А.С., Скуредина А.А., Колмогоров И.М. Кудряшова Е.В.

Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3,
e-mail: le-deygenim@my.msu.ru

На сегодняшний день актуальной является проблема одновременной доставки нескольких антибактериальных препаратов для борьбы с тяжелыми инфекциями, в том числе туберкулёза. Зачастую только один антибактериальный препарат не справляется с уничтожением патогенных микроорганизмов: требуется терапии несколькими препаратами, причем в день пациент может получать терапию до 5 раз. Это приводит к нарушению комплаенса пациента; неадекватное применение антибактериальных препаратов приводит в свою очередь к появлению мультирезистентных штаммов микроорганизмов - возбудителей тяжелых инфекций. Создание системы доставки нескольких препаратов с контролируемым высвобождением содержимого может позволить решить данные проблемы.

Такие системы одновременной доставки нескольких препаратов должны быть биосовместимы и обладать высокой ёмкостью по препаратам. Важным требованием также является возможность введения лекарственной формуляции ингаляционным путем и мукоадгезивность. Целью настоящей работы является создание новой системы доставки нескольких антибактериальных препаратов на примере клинически важных антибактериальных препаратов, используемых в лечении тяжелых инфекций: левофлоксацина и рифампицина.

Для исследования структурно-функциональных свойств липидно-полимерных систем одновременной доставки рифампицина и левофлоксацина были выбраны нейтральные липосомы на основе дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) и анионные липосомы (содержащие 20 масс.% кардиолипина), в качестве производных ЦД – моно-(6-(гексаметилендиамин)-6-дезокси)-β-циклодекстрин (NH_2-ЦД), катионный лиганд, и 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин (ГП-ЦД), носитель с неполярным гидрофобным заместителем, мукоадгезивный полимер хитозан молекулярной массы 5 кДа. Поскольку объединение данных систем доставки путем функционализации поверхности липосом ЦД затруднено, был выбран подход, связанный с получением многоточечных нековалентных комплексов липосом с производными Хит. В свою очередь, свободные аминогруппы полимера представляют собой перспективную мишень для конъюгации с производными ЦД

В работе было установлено, что пролонгированное высвобождение левофлоксацина из производных β-циклодекстрина достигается с хитозан-содержащими лигандами, развитая поверхность которых позволяет достигнуть лучшей сорбции препарата по сравнению с немодифицированным β-циклодекстрином. Был исследован фазовый переход липосом, содержащих рифампицин. Препарат вызывает резкое ускорение фазового перехода при температурах более 40 °C, что, предположительно, связано с его высокой гидрофобностью.Изменение кривой высвобождения рифампицина из липосом происходит в присутствии полимерных конъюгатов хитозана с циклодекстрином, который вызывает стерические затруднения для препарата.

Полученные результаты открывают новые перспективы создания комбинированных липидно-полимерных систем для борьбы с туберкулёзом.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ, проект 075-15-2022-397.

КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗОЙ, В ВЯЗКИХ СРЕДАХ

Немцева Е.В.[а,б], Лисица А.Е.[а], Суковатый Л.А.[а], Гульнов Д.В.[а], Кратасюк В.А. [а,б]

[а] Сибирский федеральный университет, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79, e-mail: enemtseva@sfu-kras.ru
[б] Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

Понимание механизмов влияние сред с различными физико-химическими характеристиками на ферментативный катализ важно для установления принципов регуляции биохимических процессов в живой клетке, в микроокружении сложного состава. Скорости биохимических процессов в клетке определяются многими факторами, среди которых значительную роль играет вязкость среды. Добавление различных сорастворителей в традиционные буферные растворы помогает имитировать внутриклеточные условия *in vitro*, при этом уменьшив число регуляторных эффектов. Биолюминесцентная реакция, катализируемая бактериальной люциферазой, представляет собой многостадийный процесс, включающий образование и распад как минимум четырёх интермедиатов. Механизмы влияния вязкости среды на такой биохимический процесс всё еще не установлены окончательно.

Целью данного исследования было определение диффузионно-контролируемых стадий реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *Photobacterium leiognathi*. Были проанализированы константы скоростей отдельных стадий реакции в средах с добавлением разных концентраций этиленгликоля, глицерина, глюкозы, сорбитола, сахарозы, декстрана (70 кДа) и полиэтиленгликоля (4 кДа). Константы скорости вычисляли на основе нестационарной кинетики реакции, измеренной методом остановленного потока. Кроме того, было проведено вычисление молекулярной динамики бактериальной люциферазы в окружении воды и сорастворителей для обнаружения возможного изменения структуры белка в вязких средах. Дополнительно, межмолекулярные взаимодействия люциферазы с сорастворителями исследовали методом флуоресцентной спектроскопии.

На основе полученных кинетических и структурных данных выявлены следующие механизмы влияния вязких сред на биолюминесцентную реакцию, катализируемую люциферазой *P. leiognathi*: (i) повышенная вязкость приводит к замедлению диффузии компонентов реакции и снижению скорости связывания флавинового и альдегидного субстратов, но также способствует замедлению конкурирующих «темновых» стадий реакции (распад пероксифлавинового интермедиата, автоокисление восстановленного флавина) [1]; (ii) в средах с низкомолекулярными сорастворителями наблюдается преферативное связывание с поверхностью люциферазы и вытеснение молекул воды; (iii) в средах с глюкозой, сорбитолом и сахарозой каталитическая константа люциферазы увеличивается, в присутствии этиленгликоля – уменьшается; (iv) растворы биополимеров влияют на кинетику реакции в соответствии со своей низкой вязкостью и молярной концентрацией, дополнительных эффектов вследствие явления макромолекулярного краудинга не наблюдается.

Литература
1. Lisitsa, A. E., Sukovatyi, L. A., Bartsev, S. I., Deeva, A. A., Kratasyuk, V. A., & Nemtseva, E. V. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, **22(16)**, 8827.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РНФ, проект 22-22-00724.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ СКРИНИГ АНТИБАКЕРИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ

Ломакина Г.Ю., Угарова Н.Н.

Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, 119992, Ленинские Горы, МГУ, 1/11, lomakinagalina@yahoo.com

Разработка новых быстрых методов скрининга лекарственных средств требует изучения механизма их действия на живые организмы. Биолюминесцентные тест-системы на основе живых клеток для определения чувствительности микроорганизмов к лекарственным средствам приобретают все большую популярность благодаря их высокой чувствительности и быстроте проведения анализа. Тест-система на основе живых рекомбинантных клеток *E. coli*, экспрессирующих термостабильную люциферазу светляков *Luciola mingrelica,* эффективно используется для мониторинга концентрации АТР и активности белка-люциферазы светляков внутри и вне клеток в режиме реального времени. Это позволяет оценить жизнеспособность и метаболическую активность клетки, рассчитать численность микроорганизмов, определить степень повреждения клеточной мембраны, изучить влияние антибактериальных агентов на систему синтеза/гидролиза АТР и на дыхательный метаболизм клетки. В данной работе изучено действие высокоэффективных антибиотиков полимиксинового ряда и аминогликозидов на клетки *E.coli* с помощью данной тест-системы.

Мы показали, что поликатионные циклические полипептиды (полимиксины), быстро проникая в периплазматическое пространство через внешнюю мембрану, воздействуют прежде всего на систему синтеза АТР, локализованную на внутренней мембране клетки. Это приводит к быстрому снижению до нулевых значений содержания внутриклеточного АТР (ATP_{in}) при незначительном увеличении внеклеточного АТР (ATP_{out}), т.е. синтез ATP_{in} прекращается, а остаточное содержание ATP_{in} расходуется внутри клетки. Люциферазная активность снижается внутри клетки (Luc_{in}) и растет вне клетки (Luc_{out}), что свидетельствует о необратимых повреждениях внешней и внутренней клеточной мембраны. Данные посевов подтвердили гибель клеток в присутствии антибиотика.

Иной механизм действия наблюдался для антибиотиков аминогликозидного ряда (на примере гентамицина), который, как принято считать, проникает через клеточную мембрану бактерий, подавляя бактериальный синтез белка в клетке, необратимо связываясь с аминоацильным участком 30S-субъединицы рибосомы. Мы показали, что на начальных этапах реакции ни при каких концентрациях гентамицина (0.05-1 мг/мл) величины Luc_{in} и ATP_{in} не уменьшаются, и только через сутки уровень ATP_{in} снижался до нулевых значений. Уровни ATP_{out} и Luc_{out} несколько возрастали пропорционально количеству добавленного гентамицина. Результаты посевов показали сильное, но не полное снижение количества живых клеток. Таким образом, при воздействии данного антибиотика сохранялся высокий уровень ATP_{in} и Luc_{in}, клетки оставались жизнеспособными, хотя и утратили способность к делению, переходя в состояние живых, но некультивируемых микроорганизмов. Кроме того, было показано, что чувствительность клеток к гентамицину зависит от содержания кислорода в системе: при сниженном содержании кислорода гентамицин был неэффективен; его влияние проявлялось только при сильной аэрации суспензии клеток.

Работа выполнена в рамках госрегистрационной темы МГУ имени М.В. Ломоносова Номер ЦИТИС: 121041500039-8.

БИОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ КОНВЕРСИЯ БЕЛЕНЫХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ДРЕВЕСНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ПОЛУЧЕННЫХ СУЛЬФИТНЫМ И СУЛЬФАТНЫМ СПОСОБАМИ

Майорова К.А., Аксенов А.С., Шевченко А.Р., Родичева М.А.

Северный (Арктический) федеральный университет имени М. В. Ломоносова
ул. Набережная Северной Двины, 17, Архангельск, 163002
E-mail: majorova.k@edu.narfu.ru

Древесина, представляющая собой трудногидролизуемый лигноуглеводный комплекс, является наиболее распространенным в России непищевым источником природных полисахаридов. В результате реализации химических технологий с использованием сульфатного или сульфитного варочных растворов получают древесную целлюлозу (ДЦ) как полуфабрикат для создания широкого спектра бумажной продукции. В зависимости от используемой породы древесного сырья, типа и параметров варки ДЦ могут существенно отличаться по структуре и механическим свойствам. Известно, что сульфатные ДЦ обладают преимуществами в сравнении с другими лигноцеллюлозными материалами не только с точки зрения бумагообразующих свойств, но и характеризуются высокой способностью к глубокому ферментативному гидролизу (ФГ) целлюлазами и гемицеллюлазами, в том числе с использованием комплексов карбогидраз, продуцируемых аскомицетом *Penicillium verruculosum* [1]. ДЦ, полученные сульфитными способами, изучены в меньшей степени, несмотря на то, что в настоящее время на существующих ЦБК по данной технологии сохранились биопроизводства.

Цель работы: сравнительный анализ сахаров, полученных при биоконверсии сульфатных и сульфитных ДЦ российскими коммерческими биокатализаторами *P. verruculosum*

В качестве субстрата для ФГ использовались промышленные образцы беленой лиственной сульфатной (ЛСФаЦ, 73% целлюлозы, 26% гемицеллюлоз) и хвойной сульфитной целлюлозы (ХСфиЦ, 82% целлюлозы, 14% гемицеллюлоз). Биоконверсия проводилась при загрузке ДЦ от 25 до 100 г/л с расходом биокатализаторов 10 ед. ФБ/г ДЦ. При низких концентрациях субстрата достигнута высокая степень конверсии: 88% (ХСфиЦ) и 99% (ЛСФаЦ). В ходе гидролиза ХСфиЦ образовалось больше глюкозы, в случае ЛСфаЦ наблюдалось возрастание общего количества сахаров. С увеличением концентрации субстрата преимущество по уровню глюкозы характерно для начальных этапов гидролиза ХСфиЦ, но после 48 часов обработки данные отличия между ДЦ незначительны. Гидролизаты на завершающих этапах процесса отличаются соотношением гексоз к пентозам: 5/1 при конверсии ХСфиЦ, 3/1 для ЛСфаЦ. Следовательно, ферментативная конверсия ХСфиЦ более предпочтительна для получения растворов гексоз микробиологического назначения. Высокая реакционная способность ЛСфаЦ к ФГ карбогидразами *P. verruculosum* позволяет снижать расход биокатализаторов и наряду с сахарами производить модифицированную целлюлозу близкую по кристалличности к товарным порошковым целлюлозам.

Авторы выражают благодарность МГУ им. М. В. Ломоносова и ФИЦ Биотехнологии РАН за предоставленные ферментные комплексы и хроматографический анализ углеводов.

Литература
[1] Aksenov, A. S., Tyshkunova, I.V., Poshina, D.N., Guryanova, A.A., Chukhchin, D.G., Sinelnikov, I.G., Terentyev, K.Y., Skorik, Y.A., Novozhilov, E.V., Sinitsyn, A.P. *Catalysts,* 2020, 10(5), 536. DOI: 10.3390/catal10050536.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 22-24-20136.

СОЗДАНИЕ FRET-СЕНСОРОВ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК-ХРОМОПРОТЕИН ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АКТИВНОСТИ КАСПАЗЫ 3 *IN VITRO* И *IN VIVO*

Марынич Н.К.,[а] Грановский И.Э.,[а,б] Савицкий А.П.[а,в]

[а] Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071, Москва, Ленинский проспект 33 ст. 2,
e-mail: marynich_n@mail.ru
[б] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов» им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Пущино, проспект Науки, д.5
[в] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, ул. Колмогорова, 1 ст. 11Б

FRET-сенсоры на основе флуоресцентных белков применяются для детекции активности каспазы-3 и определения ранней стадии эффекторной фазы. Сенсоры, в которых в качестве донора выступает красный флуоресцентный белок, позволяют работать в области с наименьшим поглощением и автофлуоресценцией клеток млекопитающих, а использование хромобелков в качестве акцептора нивелирует фоновую флуоресценцию [1]. Целью настоящей работы являлась разработка сенсора для определения активности каспазы *in vivo.*

В первую очередь подобран нефлуоресцирующий акцептор−хромопротеин. Потенциальными кандидатами являлись четыре хромопротеина: gfasCP, spisCP, anm2CP и Ultramarine, имеющие высокие интегралы перекрывания с красной формой SAASoti Методами гель-фильтрации (ГФ) и динамического светорассеяния (ДСР) показано, что среди всех хромопротеинов только Ultramarine является мономером. Получен сенсор TagRFP-23-Ultramarine (TR-23-U). Методами ГФ и ДСР подтверждено мономерное состояние сенсора. После инкубации с каспазой-3 интенсивность флуоресценции TagRFP возросла более чем в 2 раза, а соотношение времен жизни флуоресценции свободного и связанного TagRFP изменилось в 5,8 раз в сторону свободного TagRFP, что свидетельствовало об эффективном гидролизе сенсора каспазой-3 и нарушении FRET между белками.

Применение нового сенсора планировалось в методе флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС), который позволяет анализировать олигомерное состояние белков и, соответственно, регистрировать расщепление FRET-сенсора, однако он эффективен только на концентрациях белка порядка 10^{-8}–10^{-9} М. Для контроля концентрации в качестве флуоресцентного донора выбран бифотохромный белок moxSAASoti [2]. Для нового варианта moxSAASoti характерна высокая скорость фотоконверсии, но низкая фотостабильность красной формы, поэтому необходима оптимизация донора. Путем введения замены F97M был получен новый вариант с более стабильной и яркой красной формой. Также для более эффективного созревания в клетках млекопитающих введена замена H74K. На основе новой формы moxSAASoti был создан сенсор moxSAASoti-23-Ultramarine.

Литература
1. Savitsky A. P. *et al.* FLIM-FRET imaging of caspase-3 activity in live cells using pair of red fluorescent proteins. *Theranostics,* 2012, **2**, 215–226.
2. Marynich N. K. et al. First biphotochromic fluorescent protein moxSAASoti stabilized for oxidizing environment. *Scientific Reports.* 2022, **12**,7862,

НАПРАВЛЕННЫЙ ДИЗАЙН БИОКАТАЛИЗАТОРОВ: МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ - СЛОЙ МЕЗОПОРИСТОГО КРЕМНЕЗЕМА - ФЕРМЕНТ

Сульман А.М., Тихонов Б.Б., Гребенникова О.В., Стадольникова П.Ю., Долуда В.Ю., Матвеева В.Г.

Тверской государственный технический университет, 170026, Тверь, наб. Афанасия Никитина, 22
e-mail: matveeva@science.tver.ru

Биокатализаторам, полученным путем иммобилизации ферментов, уделяется значительное внимание благодаря сочетанию преимуществ нативных ферментов (высокая селективность, мягкие условия реакции и низкое энергопотребление) с преимуществами, получаемыми в результате иммобилизации на поверхность (повышенная стабильность катализатора в широком диапазоне pH и температур, более легкое отделение катализатора от продуктов реакции, контроль каталитических свойств и т.д.). Иммобилизация ферментов позволяет снизить стоимость процесса и улучшить качество целевых продуктов. Ферменты могут быть иммобилизованы на твердых носителях с использованием различных методов, наиболее популярными из которых являются адсорбция ферментов и ковалентное связывание через функциональные группы. Среди многочисленных материалов, используемых для иммобилизации ферментов, пористые носители (оксиды металлов или полимеры) и особенно с иерархическими порами стали центром разработки биокатализаторов. Ферментативные катализаторы на основе глюкозооксидазы (GOX) используются при окислении D-глюкозы до D-глюконовой кислоты и ее солей (глюконатов), которые применяются в чистящих средствах, пищевых добавках, лекарствах и т.д. Ранее были разработаны биокатализаторы с магнитным извлечением, состоящие из NPC оксида железа, покрытых функционализированным NH_2 твердым кремнеземом, что позволяет ковалентно присоединять GOX. Показано, что размер NPC, который, в свою очередь, определяет кривизну опорной поверхности, контролирует каталитические свойства биокатализаторов за счет различного покрытия поверхности. Несмотря на то, что мезопористые носители известны для иммобилизации ферментов, нет четкого понимания влияния размера пор на активность фермента.

В данной работе для контроля пористости слоя кремнезема использовались амфифильные ди- и триблочные сополимеры с различной длиной гидрофобных блоков, чтобы варьировать размер пор относительно гидродинамического диаметра GOX (~8 нм). В таких системах, происходит сборка амфифильных блок-сополимеров на поверхности NPC-S. Гидрофильные блоки соединяются на полярной поверхности слоя твердого кремнезема на NPC, в то время как гидрофобный блок самособирается, образуя 3D-шаблон для мезопористого слоя. Затем добавляется тетраэтоксисилáн (TEOS), гидролиз которого делает его гидрофильным и позволяет ему связываться с гидрофильными блоками блочного полимера. После конденсации гидролизованного TEOS и образования кремнезема блок-сополимер удаляют. Конечный мезопористый слой кремнезема готов к функционализации аминогруппами посредством взаимодействия с (3-аминопропил)триэтоксисиланом для ковалентного присоединения фермента с последующей реакцией с глутаровым альдегидом - линкером для создания альдегидных групп для N-концевого ковалентного присоединения GOX.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (21-19-00192).

ЭНДОЛИЗИНЫ СЕМЕЙСТВА ПЕПТИДАЗ M15_C: РАСПРОСТРАНЕНИЕ, МЕХАНИЗМ КАТАЛИЗА, РЕГУЛЯЦИЯ, ПРИМЕНЕНИЕ

Микулинская Г.В.[1], Чернышов С.В.[1], Тарлачков С.В.[1], Аракелян А.Г.[1], Прохоров Д.А.[2]

[1]Филиал Института биоорганической химии РАН, 142290, Пущино, проспект Науки, 6
e-mail: mikulinskaya@bibch.ru
[2]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3

Семейство M15 объединяет большую группу цинксодержащих пептидаз. Подсемейство C отличают особенности активного центра: Zn^{2+} координируется двумя остатками His и одним Asp, каталитический остаток – также Asp. Все охарактеризованные биохимически члены этого подсемейства являются фаговыми литическими белками (эндолизинами), специфически гидролизующими пептидогликан клеточной стенки бактерий, – L-аланил-D-глутаматпептидазами. Четыре из них найдены и изучаются авторами [1-3].

Было показано, что часть пептидаз семейства имеет неканоническую EF-подобную кальцийсвязывающую петлю. Ca^{2+} является структурным регулятором: опосредует фиксацию подвижной петли на глобулярном домене, стабилизируя фермент в каталитически активной «открытой» конформации. Активация происходит в периплазме, являющейся «депо» кальция в грамотрицательной бактериальной клетке. Анализ вирусных геномов показал, что подобная петля, а значит, и кальциевая регуляция встречается только у пептидаз подсемейства M15_C и только у эндолизинов бактериофагов таксона Caudovirales, инфицирующих грамотрицательные бактерии родов *Escherichia, Salmonella, Klebsiella, Edwardsiella, Pectobacterium, Aeromonas, Shewanella.*

Результаты сайт-направленного мутагенеза двух представителей семейства M15_C свидетельствуют, что важную роль в катализе пептидазами играет консервативный остаток Trp. Расположенный близ активного центра, он экспонирован в раствор и существенно влияет как на плотность упаковки гидрофобного ядра белковой глобулы (и взаимное расположение координирующих цинк остатков His), так и на способность фермента связывать субстрат. Интересно, что у кальцийсвязывающих пептидаз с заменой Trp падает также сродство к регуляторному иону Ca^{2+}.

Поскольку связь L-Ala-D-Glu встречается в пептидогликане подавляющего большинства бактерий, как грамотрицательных, так и грамположительных, потенциально пептидазы подсемейства M15_C – антибактериальное средство широкого спектра действия. Нами было предложено нетерапевтическое применение широкоспецифичного эндолизина миобактериофага RB49 в качестве эффективного компонента ферментного коктейля для выделения геномной ДНК из бацилл [4].

Литература
1. Mikoulinskaia G.V. et al. *J Gen Virol* 2018, **99**, 402-415. doi: 10.1099/jgv.0.001014.
2. Prokhorov D.A. et al. *RSC Adv.* 2015, **5**, 41041-41049. doi: 10.1039/C5RA05993C.
3. Kovalenko A.O. et al. *Metallomics* 2019, **11**(4), 799-809. doi: 10.1039/c9mt00020h.
4. Chernyshov et al. *World J Microbiol Biotechnol* 2023, **39**, 31. doi: 10.1007/s11274-022-03475-2.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 23-24-00210.

РОЛЬ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПРОЦЕССА ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ ДНК

Моор Н.А., Васильева И.А., Анарбаев Р.О., Лаврик О.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского Отделения Российской Академии Наук, 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева 8, e-mail: moor@niboch.nsc.ru

Эффективность коррекции наиболее частых повреждений ДНК у млекопитающих с помощью многостадийного процесса эксцизионной репарации оснований (Base excision repair, BER) зависит от согласованного действия ферментов, катализирующих отдельные стадии. Многочисленные взаимодействия между ферментами и белковыми факторами способствуют координации. Нами охарактеризован с помощью различных биофизических методов ряд комплексов, образованных ключевыми и вспомогательными ферментами апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазой 1 (APE1), ДНК-полимеразой β (Polβ), ДНК-лигазой IIIα (LigIIIα) и тирозил-ДНК-фосфодиэстеразой 1 (TDP1) друг с другом и с архитектурным белком XRCC1, а также с детекторами ДНК-разрывов поли(АДФ-рибоза)-полимеразами (PARP) 1 и 2 [1, 2]. Самым стабильным является комплекс XRCC1 с Polβ. Впервые показано прямое и XRCC1-опосредованное взаимодействие Polβ с LigIIIα [3]. Структура комплексов и их стабильность модулируются в различной степени ДНК-интермедиатами BER [1]. PARP2 функционирует в процессе BER как PARP1, образуя более динамичные комплексы с общими белками-партнерами, а его комплекс с PARP1 способен регулировать уровень автомодификации PARP1 в XRCC1-независимой репарации [4]. Специфичный для эукариот неструктурированный N-концевой фрагмент APE1 важен для ДНК-зависимой модуляции взаимодействий с белками и регуляции основной активности фермента другими белками BER [5]. Впервые показаны взаимодействие APE1 с поли(АДФ-рибозой) и PARP1-катализируемая модификация фермента в тройном комплексе с AP сайт-содержащей ДНК определенной структуры, что позволило предположить новую регуляторную роль мультифункционального белка [6].

Впервые изучено влияние структурной реорганизации белка XRCC1 в результате окислительной модификации двух остатков цистеина на его архитектурную роль в формировании репарасом. Окисление снижает сродство белка XRCC1 к поли(АДФрибозе) и акцепторную активность в реакции АДФрибозилирования, что подавляет ингибирующее действие белка XRCC1 и его комплекса с Polβ на автомодификацию PARP1 и PARP2 и может регулировать время жизни репаративного комплекса с поврежденной ДНК [7]. От окислительно-восстановительного статуса XRCC1 также зависит сам процесс репарации ДНК в реконструированной системе [3].

Литература
1. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Antson A.A, Lavrik O.I. *Nucleic Acids Res*., 2015, **43**, 6009-6022.
2. Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Moor N.A., Lavrik O.I. *BBA*, 2018, **1867**, 297-305.
3. Васильева И.А., Моор Н.А., Лаврик О.И. Биохимия, 2020, **85**, 335-347.
4. Vasil'eva I.A., Moor N.A., Anarbaev R.O., Kutuzov M.M., Lavrik O.I. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, **22**, 4679.
5. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Lavrik O.I. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 3122.
6. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Kuznetsov N.A., Lavrik O.I. *Biochimie*, 2020, **168**, 144-155.
7. Васильева И.А., Моор Н.А., Лаврик О.И. Доклады академии наук, 2019, **489**, 89-94.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 22-14-00112.

МЕХАНИЗМЫ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ РАЗРЫВА P-O СВЯЗИ В НУКЛЕОЗИДФОСФАТАХ

Мулашкина Т.И.[а], **Кулакова А.М.**[а], **Хренова М.Г.**[а,б], **Немухин А.В.**[а,в]

[а]*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,*
119234, Москва, Ленинские горы 1 стр. 3
e-mail: mulashkinati@my.msu.ru
[б]*Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»*
Российской академии наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха,
119071, Москва, Ленинский проспект 33 стр. 2
[в]*Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН,*
119334, Москва, ул. Косыгина 4

На протяжении нескольких десятилетий обсуждается проблема определения типа механизма, по которому протекает разрыв P-O связи сложных эфиров фосфорной кислоты как в растворителе, так и в белке. В результате таких процессов уходящая группа (LG) замещается нуклеофильным агентом (Nu). Замещение может происходить либо ступенчато с образованием устойчивого интермедиата, либо согласовано через одно переходное состояние. Кроме того, различают ассоциативный механизм, при котором нуклеофильная атака предшествует разрыву $P\text{-}O_{LG}$, и диссоциативный механизм, при котором сначала происходит разрыв $P\text{-}O_{LG}$. В случае согласованного механизма степень образования связи $P\text{-}O_{Nu}$ и расщепления $P\text{-}O_{LG}$ связи в переходном состоянии определяет является ли механизм диссоциативным и ассоциативным. Определение типа механизма экспериментально или вычислительно – трудоемкая задача. В связи с этим в данной работе был предложен способ определения механизма разрыва (ассоциативный или диссоциативный механизм) P-O связи в различных ферментативных реакциях, основываясь только на анализе электронной плотности в структуре фермент-субстратного комплекса.

Расчёты электронной плотности фермент-субстратных комплексов проводились с использованием комбинированного метода квантовой и молекулярной механики с помощью программного Tcl интерфейса ChemShell с эффективным оптимизатором DL-FIND и программным пакетом квантовой химии TURBOMOLE. Квантовая подсистема описывалась методом функционала электронной плотности с гибридным функционалом PBE0 и дисперсионной поправкой D3, а также с двухэкспонентным базисом с поляризационными функциями на всех атомах 6-31G**. Лапласиан электронной плотности рассчитывался в программном пакете Multiwfn.

В данной работе в качестве критерия определения типа механизма, мы использовали лапласиан электронной плотности $\nabla^2\rho(r)$. Знак лапласиана электронной плотности указывает на области концентрации электронной плотности ($\nabla^2\rho(r) < 0$) или деконцентрации ($\nabla^2\rho(r) > 0$) вокруг данной точки r. Таким образом, если вдоль линии связи наблюдается плато с $\nabla^2\rho(r) > 0$, это показывает склонность к разрыву связи между атомом фосфора и уходящей группой, что способствует протеканию нуклеофильного замещения по диссоциативному механизму. В случае ассоциативного механизма наблюдается плато с $\nabla^2\rho(r) < 0$.

В связи с этим, мы предлагаем использовать лапласиан электронной плотности вдоль связи фосфора с уходящей группой ($P\text{-}O_{LG}$) в фермент-субстратном комплексе в качестве критерия определения типа механизма ферментативного разрыва P-O связи.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 19-73-20032).

ИММУННЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОНОЭФИРОВ ФТАЛАТА В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Мухаметова Л.И., Жарикова О.В., Арутюнян Д.А., Шанин И.А., Еремин С.А.

Химический факультет, Московский государственный университет, liliya106@mail.ru

Диэфиры фталата (ДЭФ) интенсивно используются с 1960-х годов как пластификаторы в фармацевтической продукции, производстве строительных материалов, упаковке пищевых продуктов, электронике и медицинских устройствах. Фталаты не образуют ковалентных связей с полимерами, что способствует их быстрому высвобождению в окружающую среду. Попадая в организм человека при вдыхании, проглатывании, проникновении через кожу или даже внутривенно, ДЭФ гидролизуются до моноэфирных форм (МЭФ) способных нанести вред здоровью. Исследование воздействия фталатов на человека требуют определения концентраций их метаболитов в испытуемых образцах. Поэтому возникает необходимость в создании быстрых и надежных аналитических методов определения МЭФ.

Большинство аналитических методик определения МЭФ - это хроматографические методы, которые достаточно трудоемки и дороги. Иммуноферментный анализ (ИФА) и поляризационно флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА) составляют хорошую альтернативу для количественного анализа МЭФ. Целью настоящей работы было получить иммунореагенты и разработать ИФА и ПФИА методы определения монобензил (МБзФ) и монобутил фталатов (МБФ) в водах открытых водоемов.

Были получены и охарактеризованы конъюгаты МБзФ и МБФ с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и овальбумином (ОВА). МБзФ-БСА и МБФ-БСА использованы для иммунизации кроликов и получены антисыворотки, которые были отобраны в разные сроки после введение антигенов. Получены и охарактеризованы конъюгаты (трейсеры) МБзФ и МБФ с флуоресцентными метками (ЭДФ, ГАФ, Alexa, Flu-C6-NH_2). Данные трейсеры обладали высокой специфичностью и не связывались с неиммунными сыворотками. Антисыворотки полученные против МБзФ и МБФ были протестированы методами ИФА и ПФИА и показано, что на второй и третий цикл иммунизации были получены высокоаффинные антисыворотки против МБзФ и МБФ, с которыми и были разработаны два иммунных метода анализа. Конъюгаты МБзФ-ОВА и МБФ-ОВА использованы для разработки ИФА метода определения. Оптимизирована ИФА методика определения МБзФ и МБФ: подобраны концентрации сорбированных в лунках конъюгатов МБзФ-ОВА и МБФ-ОВА, разведение антител. Предел обнаружения МБзФ и МБФ методом ИФА составил 100 нг/мл. Подобрана пара иммунореагентов для разработки ПФИА метода определения монофталатов, выбраны трейсеры, показавшие максимальное связывание с антисыворотками против МБзФ и МБФ, время анализа, оптимизирована методика для определения монофталатов в воде с пределом обнаружения 30 нг/мл. Тестом введено/найдено апробированы методики ИФА и ПФИА обнаружения монофталатов и показано, что процент открытия составил от 80 до 110%. Используя данные методы проверены воды водоемов Московского региона и показано, что данных фталатов с концентрацией выше предела обнаружения не было найдено.

Таким образом в данной работе получены иммунореагенты и разработаны два формата иммуноанализа определения метаболитов ДЭФ монобутил и монобензил фталатов: ИФА и ПФИА. Данные методики апробированы методом введено/найдено и протестированы реальные образцы вод открытых водоемов Московского региона.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14- 00306).

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ГУАНОЗИНТРИФОСФАТА БЕЛКОВЫМИ КОМПЛЕКСАМИ RAS-GAP

Немухин А.В., Григоренко Б.Л., Поляков И.В., Хренова М.Г.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет, Москва, Ленинские горы, 1/3.
E-mail: anem@lcc.chem.msu.ru

Интерес к экспериментальному и теоретическому изучению механизма химической реакции гидролиза гуанозинтрифосфата (GTP) до гуанозиндифосфата (GDT) и неорганического фосфата (Pi), катализируемой малой ГТФазой Ras в комплексе с белком-ускорителем GAP, объясняется большим значением Ras в онкологических исследованиях. Точечные замены аминокислотных остатков по определенным позициям, наблюдаемые у множества пациентов, сохраняют активную форму сигнального белка Ras за счет замедления скорости реакции $GTP + H_2O \rightarrow GDP + Pi$ в активном центре фермента.

В докладе будут приведены результаты компьютерного моделирования механизмов реакции гидролиза GTP изоформами Ras (HRas, KRas) в комплексах с ускорителями p120GAP и NF1 на основе реакционных энергетических профилей, рассчитанных современными методами молекулярного моделирования. Применяются методы квантовой химии и молекулярной динамики с потенциалами квантовой механики/молекулярной механики. Для построения начальных молекулярных моделей используются данные рентгеноструктурного анализа, относимые либо к аналогу возможного переходного состояния, либо к фермент-субстратному комплексу с негидролизуемым аналогом субстрата.

Результаты моделирования позволяют представить возможные пути сложной реакции гидролиза GTP в комплексах Ras-GAP, совместимые с данными структурных и кинетических исследований для нативных белков и мутантов. Показана роль ключевых аминокислотных остатков Gln61, Gly12, Gly13 в молекуле Ras и аргинина в белках-ускорителях GAP.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 19-73-20032.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ТЕСТ-ПОЛОСКИ С ШИРОКИМ ЛИНЕЙНЫМ ДИАПАЗОНОМ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ГЛЮКОЗЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

Никитина В.Н., Соловьев И.Д., Карякин А.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1-3,
e-mail: niki-vita@yandex.ru

Контроль концентрации глюкозы в крови является одним из самых распространенных медицинских тестов, доступных вне клиники. Электрохимические тест-полоски, используемые с персональными глюкометрами, содержат в своем составе иммобилизованный фермент и медиатор – переносчик электронов. Для обеспечения точности измерений в установленном международными стандартами диапазоне (от 0,6–1 до 30–33,3 мМ глюкозы) необходима как высокая чувствительность, так и линейность калибровочной кривой. В соответствии с ферментативной кинетикой зависимость аналитического сигнала биосенсора от концентрации глюкозы имеет гиперболический вид. Смена лимитирующей стадии процесса за счет создания диффузионных ограничений позволяет пролонгировать диапазон линейности в область высоких концентраций.

В данной работе предложена совместная иммобилизация низкомолекулярных медиаторов и глюкозооксидазы в полиэлектролитных мембранах, позволяющая достичь высокого верхнего предела линейности отклика биосенсора (50мМ). Мембранообразующая смесь для одностадийной модификации электродов обеспечивает иммобилизацию фермента, с одной стороны, и создает диффузионные ограничения для медиатора, с другой. Рассмотрено влияние величины заряда диффузионно-подвижных медиаторов и полиэлектролита на коэффициент диффузии медиатора и на аналитические характеристики биосенсора. Показано, что скорость высвобождения медиатора из мембраны определяет чувствительность получаемых биосенсоров [1]. Найдено оптимальное содержание полимера в мембране, обеспечивающее максимальную активность иммобилизованного фермента. Благодаря дополнительной адсорбции некоторых медиаторов в мембране удается пролонгировать диапазон линейности отклика биосенсора.

Рекордный диапазон линейной от 1 мМ до 50 мМ глюкозы был достигнут при регистрации амперометрического отклика на 5-й секунде после приложения потенциала. Таким образом, полученные тест-полоски применимы для определения глюкозы в неразбавленной крови. Определение концентрации глюкозы с помощью разработанных тест-полосок валидировано путем анализа стандартных образцов сыворотки и крови. Кроме того, тест-полоски, изготовленные путем совместной иммобилизации медиатора и фермента в хитозане, сохраняют линейный отклик в широком диапазоне и 90% чувствительности при тестировании в цельной крови [2].

Литература

1. Nikitina V.N., Daboss E.V., Vokhmyanina D.V., Solovyev I.D., Andreev E.A., Komkova M.A., Karyakin A.A., *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2023, 117445.
2. Nikitina V.N., Karastsialiova A.R., Karyakin A.A., *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, **220**, 114851.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 22-23-00545, https://rscf.ru/project/22-23-00545/

РЕГУЛИРУЕМЫЕ НА УРОВНЕ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9

Саковина Л.В., Горленко Е.С., Вохтанцев И.П., Семиколенова О.А., Агалакова Е.В., Мещанинова М.И., Новопашина Д.С.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. акад. Леврентьева, 8, danov@niboch.nsc.ru

Разработка регулируемых молекулярно-биологических систем является актуальной задачей современной биохимии, молекулярной биологии и биоорганической химии. В качестве регуляторов активности могут выступать различные физико-химические стимулы, такие как, облучение светом, изменение pH, температура, изменение концентраций определенных веществ и др. Системы геномного редактирования востребованы в настоящее время для решения многих задач современной биологии. Регулировать системы геномного редактирования можно как на уровне белка, так и на уровне направляющей РНК. Введение определенных модификаций в структуру и последовательность направляющей РНК позволяет создавать регулируемые системы геномного редактирования.

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

Нами было выбрано два варианта регуляции системы: облучение светом определенной длины волны и аллостерический способ регуляции системы. Был проведен дизайн и синтез фоточувствительных направляющих РНК трех типов. В первом варианте направляющие РНК содержали фоторасщепляемые линкеры, позволяющие разрушить РНК путем облучения и, таким образом, отключить систему редактирования в определенный момент времени [1]. Во втором варианте направляющие РНК представляли собой циклические РНК, содержащие фоторасщепляемый линкер. В этом случае циклическая РНК не активна вплоть до облучения, а в результате облучения происходит ее линеаризация и активация системы. Третий вариант направляющих РНК содержал в своем составе линкеры не основе азобензола, изменяющего свою конформацию при облучении. Облучение в УФ диапазоне приводит к переходу молекулы в цис-изомер, а облучение в видимом диапазоне приводит к транс-изомеру. Такой вариант модификации РНК позволяет обратимо изменять ее пространственную структуру и влиять на сродство РНК к ДНК-мишени, а также к белку Cas9, активируя или инактивируя систему геномного редактирования в зависимости от длины волны облучения. Для создания систем с аллостерической регуляцией нами были созданы направляющие РНК с внедренными в их структуру аптамерами к различным молекулам (теофиллин, производные тиазолового оранжевого и пептиды). Разработаны варианты, которые активируются в присутствии этих молекул, и дезактивирующиеся варианты систем.

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

Литература

1. Новопашина Д.С., Хабардина Е. А., Мещанинова М.И., Вохтанцев И.П., Жарков Д.О., Веньяминова А.Г. *Патент 2765159 РФ*, 2022.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 22-14-00294.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ БЕЗОТХОДНОГО ПРОИЗВОДСТВА ПИЩЕВОЙ КЛЕТЧАТКИ С ПОМОЩЬЮ ФЕРМЕНТНЫХ КОПЛЕКСОВ

Осипов Д.О., Зоров И.Н., Рожкова А.М.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, стр. 2
doosipov@gmail.com

Доля пивной дробины составляет 80% в общей массе всех отходов пивоваренного производства. В России расположено более 400 заводов, а каждый завод образует до 35 тысяч тонн пивной дробины. Учитывая, что ее невозможно хранить и перевозить, то утилизация такого объема отходов пивоваренного производства становится весьма дорогостоящим предприятием. Таким образом, актуальным является переработка пивной дробины на месте в непрерывном безотходном цикле.

Нами была разработана технология получения пищевой клетчатки из пивной дробины комбинацией методов физической и ферментативной обработки. На первом этапе из пивной дробины извлекали жиры экстракцией ацетоном. Затем ее измельчали до размера частиц не более 0,1 мкм. Далее следовал этап ферментативной обработки, состоящий из нескольких стадий. На первой проводили обработку термостабильной α-амилазой из расчета 2 ед/1 г крахмала в течение 2 часов с гидромодулем 10. После инактивация и остывания смеси ее в течение 2 часов обрабатывали смесью препаратов, содержащих пенициллопепсин, лейцинаминопептидазу и оризин общей дозировкой 2 ед/1 г белка. Осадок был отделен центрифугированием и лиофильно высушен.

На последней стадии сухой остаток для осветления и увеличения влагоудерживающей способности (ВУС) подвергали модификации ферментными препаратами (ФП) полисахаридмонооксигеназы, танназы, глюкозооксидазы, сволленина, пергидролазы и комплексном ФП целлюлаз в различных комбинациях. Было показано, что наибольшее увеличение ВУС достигается при использовании комбинации ФП целлюлаз с ФП танназы и ФП сволленина. При этом полученный продукт имел светло-желтый цвет и практически не обладал запахом и вкусом.

ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНАЯ ТЕРАПИЯ – КАК НОВЫЙ МУЛЬТИДИСЦИПЛИНАРНЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ ГЛИОМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Павлова Г.В.[1,2,3]*, Колесникова В.А.[1], Усачев Д.Ю.[2], Копылов А.М.[4]

[1] Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН
117485 Москва, Россия, ул. Бутлерова, 5А
[2] ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко Минздрава России
125047 Москва, Россия, 4-я Тверская-Ямская ул., 16
[3] Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России
119991 Москва, Россия, Большая Пироговская ул., 2, стр.4
[4] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
119991 Москва, Россия, Воробьевы Горы ул
**e-mail: lkorochkin@mail.ru*

Глиобластома является одной из самых тяжелых форм опухолеобразования в организме человека с крайне неблагоприятным прогнозом. Встречаемость данной патологии составляет 3,5 случая на 100 000 населения ежегодно. На данный момент не существует эффективного способа лечения этого злокачественного типа образований мозга. Все известные методы лечения (хирургия, лучевая терапия, химиотерапия) дают лишь незначительное увеличение времени жизни пациента. Гетерогенная структура глиобластомы с аберрантной регуляцией клеточной пролиферации позволяет опухоли выживать при различных терапевтических воздействиях. При лучевой терапии или химиотерапии большинство опухолевых клеток гибнет, однако, незначительная часть клеток оказывается устойчивой к воздействию и дает начало рецидиву опухоли. Таким образом, опухоль способна сопротивляться различным видам терапии и активно разрастаться. Неудачи в терапии способствовали пониманию, что нужно искать новые подходы к лечению глиобластомы. Глиома состоит из опухолевых стволовых клеток и их «дочерних опухолевых клеток» – незрелых клеток-предшественников. Противоположная, используемому цитотоксическому воздействию, стратегия - стимулировать «созревание» опухолевых клеток, что должно привести к потере их пролиферативного потенциала. Нами предложен принципиально новый подход к лечению глиомы – «дифференцировочная терапия», который основан на цитостатическом воздействии на клетки аптамера biG3T, способным блокировать пролиферацию опухолевых клеток, в комбинации с молекулами-индукторами, управляющими каскадами нейрогенеза - SB431542, LDN-193189, Purmorphamine, BDNF. Молекулы-индукторы SB431542, LDN-193189, Purmorphamine, BDNF используют для воздействия на каскады индуцированных е плюрипотентных е клеток и (ИПСК) для их дифференцировки в нейроны. При временном снижении пролиферативной активности опухолевых клеток после воздействия аптамера, молекулы-индукторы способны направить дифференцировку опухолевых клеток в зрелое состояние. Дифференцировочная терапия оказывается эффективной и для опухолевых стволовых Nestin, PROM1(CD133)-позитивных клеток, устойчивых к химиотерапии и лучевой терапии. Исследования на клеточных культурах глиом пациентов высокой степени злокачественности показали эффективность подобного подхода *in vitro*. Пилотные исследования на животной модели с глиобластомой *in vivo* также показали перспективность данного метода.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (грант № 075152020809 (13.1902.21.0030))

МИКРОГЕЛЬ-ФЕРМЕНТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТЕЙ И СОЗДАНИЯ БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ

Пергушов Д.В., Шарифуллин Т.З., Шалыбкова А.А., Сиголаева Л.В.

Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы 1/3, e-mail: pergush@genebee.msu.ru

Эффективная и недеструктивная иммобилизация ферментов на сенсорных поверхностях является одной из важнейших задач при конструировании биосенсоров. Во многих случаях подобную иммобилизацию биомолекул можно реализовать, используя для модификации сенсорной поверхности полимеры, где полимер, формирующий на ней покрытие, играет роль «клея», который прочно удерживает ферменты на сенсорной поверхности [1]. Сополимерные микрогели, проявляющие двойную pH- и термочувствительность, представляют собой значительный интерес. Они способны эффективно адсорбироваться на (сенсорных) поверхностях различной природы, а их частицы являются высокоемкими контейнерами для ферментов, обеспечивая связанным биомолекулам благоприятное (обогащенное водой) микроокружение [2]. Вплоть до настоящего времени микрогель-ферментные пленки на сенсорной поверхности формировали путем последовательной адсорбции сначала полимерного, а затем биокомпонента [3]. В данной работе рассмотрен новый подход, который заключается в том, что сначала в водном растворе получают микрогель-ферментный комплекс, а затем осуществляют его адсорбцию на сенсорную поверхность.

В качестве микрогеля использовали катионный микрогель, представляющий собой сшитый сополимер *N*-изопропилакриламида и диметиламинопропилметакриламида, содержащий примерно 9.2 % (мольн.) диметиламинопропилметакриламидных звеньев. Глюкозооксидазу (pI 4.2) выбрали в качестве модельного фермента. Микрогель-ферментный комплекс получали при pH 7, то есть в условиях, когда полимерный компонент и биокомпонент противоположно заряжены. Связывание глюкозооксидазы микрогелем в растворе было подтверждено методом лазерного микроэлектрофореза, а основные закономерности адсорбции полученных микрогель-ферментных комплексов были исследованы методом пьезоэлектрического микровзвешивания с мониторингом диссипации. Амперометрические глюкозные биосенсоры с высокой чувствительностью и хорошей операционной стабильностью были получены путем адсорбции предварительно сформированных микрогель-ферментных комплексов на поверхность планарных графитовых электродов, модифицированных наночастицами диоксида марганца.

Литература

1. Rodriguez-Abetxuko A., Sánchez-deAlcázar D., Muñumer P., Beloqui A. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020, **8**, 830.
2. Plamper F.A., Richtering W. *Acc. Chem. Res.*, 2017, **50**, 131.
3. Sigolaeva L.V., Pergushov D.V., Gladyr S.Yu., Kurochkin I.N., Richtering W. *Adv. Mater. Interfaces*, 2022, **9**, 2200310.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 22-24-00424.

АУТОТРАНСПОРТЕР *PSYCHROBACTER CRYOHALOLENTIS* K5^{T} И КОНСТРУИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ КЛЕТОЧНОГО ДИСПЛЕЯ

Петровская Л.Е.[а], **Шингарова Л.Н.**[а], **Крюкова Е.А.**[а], **Долгих Д.А.**[а,б]

[а] *Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
E-mail: lpetr65@yahoo.com
[б]*Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12*

Семейство аутотранспортеров (АТ) включает в себя белки, локализованные во внешней мембране Грам-отрицательных бактерий. Они состоят из N-концевого пассажирского и С-концевого транслокаторного доменов, соединенных альфа-спиральным линкером. Природный пассажирский домен АТ может быть заменен различными белками с целью их дисплея на клеточной поверхности.

Кодирующая последовательность потенциального АТ была обнаружена в геноме психротрофного микроорганизма *Psychrobacter cryohalolentis* K5^{T}, выделенного из вечномерзлого грунта. На основании гомологии аминокислотных последовательностей установлено, что его пассажирский домен представлен липазой, относящейся к семейству GDSL [1]. Проведено клонирование гена АТ и его экспрессия в клетках *E. coli.* Исследование липолитической активности штамма-продуцента показало, что АТ эффективно экспонируется на поверхности клеток. Сконструированы гены гибридных белков, содержащих различные пассажирские домены, в том числе эстеразу EstPc *P. cryohalolentis* K5^{T}, 10 домен фибронектина человека (^{10}Fn3) [2, 3], флуоресцентный белок mCherry, олиго-α-1,6-гликозидазу *Exiguobacterium sibiricum* [4]. Показано, что объединение с транслокаторным доменом АТ *P. cryohalolentis* является эффективным способом экспонирования различных белков на клеточной поверхности. Разработаны подходы к повышению уровня дисплея ^{10}Fn3 при помощи совместной экспрессии с EstPc [2], а также с использованием делеционных вариантов АТ [5]. Полученные конструкции могут быть использованы, в частности, в белковой инженерии искусственных связывающих белков на основе ^{10}Fn3 и для создания цельноклеточных биокатализаторов с различной активностью.

Литература
1. Petrovskaya L. *et al.* Cell surface display of cold-active esterase EstPc with the use of a new autotransporter from *Psychrobacter cryohalolentis* K5^{T}. Extremophiles, 2015, **19**, 161-170.
2. Petrovskaya L. *et al.* Fusion with the cold-active esterase facilitates autotransporter-based surface display of the 10th human fibronectin domain in *Escherichia coli. Extremophiles*, 2018, **22**, 141-150.
3. Шингарова Л.Н., Петровская Л.Е., и др. Конструирование искусственных ФНО-связывающих белков на основе 10-го домена фибронектина III типа с помощью бактериального дисплея. *Биохимия*, 2018, **83**, 903-914.
4. Шингарова Л.Н., Петровская Л.Е., и др. Дисплей олиго-α-1,6-гликозидазы Exiguobacterium sibiricum на поверхности клеток *Escherichia coli. Биохимия*, 2023, **88**, в печати.
5. Шингарова Л.Н., Петровская Л.Е., и др. Делеционные варианты аутотранспортера P. cryohalolentis повышают эффективность экспонирования 10FN3 на поверхности клеток *Escherichia coli. Биохимия*, 2022, **87**, 1223-1231.

Работа выполнена в рамках Госзадания ИБХ РАН № FMFM-2019-0007 (0101-2019-0007).

ОБНАРУЖЕНИЕ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ ЧИПОВ К АСМ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ АПТАМЕРАМИ

Плешакова Т.О., Иванов Ю.Д., Арчаков А.И.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича»
119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8,
e-mail: topleshakova@yandex.ru

Аптамеры являются перспективными молекулярными зондами в системах биоанализа, основанных на принципе взаимодействия лиганд/мишень. В докладе рассмотрены особенности использования аптамеров в системе высокочувствительного анализа с применением комбинации биоспецифического фишинга и метода атомно-силовой микроскопии (АСМ). Использование атомно-силового микроскопа как молекулярного детектора в качестве системы для регистрации комплекса аптамер/мишень на атомарно ровной поверхности определяет высокую чувствительность анализа. Рассмотрены примеры использования чипов к АСМ – специально приготовленных подложек с иммобилизованными зондами, для детекции белков в модельных растворах и разбавленных биологических образцах (сыворотка и плазма крови). Обсуждаются направления развития исследований в области разработки аптамеров для использования в системе биоспецифического фишинга.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№122030100168-2).

НОВЫЕ БЕЛКИ ЛАКТОБАКТЕРИЙ, СИНТЕЗИРУЮЩИЕСЯ В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ ПАТОГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ

Пометун А.А.[а,б], Шапошников Л.А.[а,б], Широкова А.А.[а,б], Савин С.С.[а,б], Атрошенко Д.Л.[а,б], Пометун Е.В.[в], Чикурова Н.Ю.[а,б], Тишков В.И.[а,б]

[а]Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071 Москва, Россия, e-mail: aapometun@gmail.com
[б]Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия
[в]ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991 Москва, Россия

Известно, что приём лакто- и бифидобактерий положительно влияет на состояние здоровья человека, в том числе при борьбе с бактериальными инфекциями, но конкретные механизмы этого положительного действия до сих пор не изучены детально. Возможным объяснением такого действия лактобактерий является секреция ими специфических белков, которые помогают бороться с патогенными организмами. В частности, оказалось, что при культивировании бактерий рода *Lactobacillus* в присутствии клеток рода *Klebsiella*, лактобактерии синтезируют ряд дополнительных белков, способствующих подавлению роста клебсиелл [1]. Анализ с помощью тандемной MALDI/TOF/TOF спектрометрии показал, что среди белков, синтезирующихся только в ответ на присутствие клебсиелл, есть гидролазы (по всей видимости, способствующие разрушению пептидных сшивок в пептидогликане клебсиелл или углеводного остова этого пептидогликана), ферменты, гидролизующие нуклеиновые кислоты, и другие белки метаболизма. Выделение таких белков и изучение их свойств могут быть полезными как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения. С одной стороны, это возможно позволит приблизиться к пониманию механизма действия лактобактерий, с другой – открывает перспективу создания новых антибактериальных препаратов.

На настоящий момент нами проведено моделирование структур для некоторых ферментов лактобактерий, начаты эксперименты по получению этих белков, а также изучению их свойств. Были получены генетические конструкции, содержащие гены рибонуклеозидгидролазы RihC и одного из белков метаболизма – L-лактатдегидрогеназы (L-LDH), проведена экспрессия этих белков в клетках *E.coli*, очистка методом аффинной хроматографии и разработка методов определения их активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда грант № 23-64-10029

Литература

Savinova, O.S.; Glazunova, O.A.; Moiseenko, K.V.; Begunova, A.V.; Rozhkova, I.V.; Fedorova, T.V. Exoproteome Analysis of Antagonistic Interactions between the Probiotic Bacteria Limosilactobacillus reuteri LR1 and Lacticaseibacillus rhamnosus F and Multidrug Resistant Strain of Klebsiella pneumonia. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 10999. https://doi.org/10.3390/ijms222010999

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА КОРОВ, ВЕРБЛЮДОВ И ЯКОВ ВЫЯВИЛ ЕЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ И ПУТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Бегматов Ш.А.[a], Кадников В.В.[a], Белецкий А.В.[a], Марданов А.В.[a], Карначук О.В.[b], Равин Н.В.[a]

[a] Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский просп. д. 33, стр. 2
e-mail: nravin@biengi.ac.ru
[b] Томский государственный университет, 634050, Томск, пр. Ленина, 36

Микробиота желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) сельскохозяйственных животных играет ключевую роль в их нормальной жизнедеятельности, обеспечивая переваривание пищи и усвоение питательных веществ. У травоядных животных микробиота ЖКТ является необходимым инструментом, обеспечивающим гидролиз сложных растительных полисахаридов, включая целлюлозу и гемицеллюлозы.

С целью идентификации ключевых представителей микробиоты, обеспечивающих деградацию растительных полисахаридов и участвующих в этом гидролитических ферментов мы провели метагеномный анализ образцов фекалий 21 коров, 6 двугорбых верблюдов (*Camelus bactrianus*), и 3 яков (*Bos mutus*). Во всех микробиомах доминировали бактерии филумов *Firmicutes и Bacteroidota*, особенностью верблюдов было большее по сравнению с коровами и яками содержание бактерий филума *Spirochaetota и метаногенных архей. Результаты кластерного анализа показали*, что микробные сообщества коров и яков кластеризуются совместно, а микробиоты ЖКТ верблюдов образуют отдельный кластер.

В результате секвенирования метагеномов было собрано 905 геномов представителей микробиоты ЖКТ, в которых было идентифицировано 48167 гликозил-гидролаз, 16580 гликозил трансфераз, 3200 карбогидрат-связывающих модулей (CBM) и 1282 полисахарид лиаз. Количество гидролаз достигает 260 на геном (в среднем – около 50 для коров и верблюдов и 30 для яков), наиболее часто встречаются семейства GH2, GH3, GH5, GH13, GH20, GH43, GH78, GH109 и GH163. В микробиоме верблюдов по сравнению с коровами и яками значительно чаще встречаются эндоглюканазы (GH5, GH9) и эндоксиланазы (GH10, GH43), а также CBM домены (CBM4, CBM6, CBM13, CBM22, CBM35, CBM91), обеспечивающие связывание ферментов с целлюлозой и ксиланом. В докладе будут представлены результаты сравнительного анализа гидролитического потенциала различных групп бактерий микробиома ЖКТ, его зависимость от характера потребляемой животными пищи, механизмы накопления генов гидролитических ферментов в геномах, связанные с дупликациями и горизонтальным переносом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-1401 от 03.11.2021г.).

СОЗДАНИЕ НОВОГО ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМОГО ИНСТРУМЕНТА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ СЕРЫ

Раевский Р.И.,[а,б] **Храмова Ю.В.,**[а,в] **, Комбаров И.А.,**[в] **Сергеева А.Д.,**[а,в] **Билан Д.С.**[а,б,г]

[а] Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
e-mail: riraevsky@mail.ru
[б] Лаборатории синтетических нейротехнологий НИИ трансляционной медицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, стр. 1
[в] Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,
[г] Лаборатория экспериментальной онкологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, стр. 1

Активные формы серы (АФС): H_2S, персульфиды, полисульфиды, сульфеновые кислоты, нитрозотиолы являются регуляторами апоптоза и окислительного стресса, также для них показаны цитопротекторные и вазодилатирующее действия. Существующие на сегодняшний день подходы не позволяют проводить мониторинг динамики АФС в живых интактных системах в режиме реального времени с детализацие на уровне отдельных клеточных копмартментов. В данной работе мы разрабатывали генетически кодируемый биосенсор на основе флуоресцентного белка cpYFP. В качестве сенсорного домена для регистрации АФС мы выбрали белок BigR из *Xylella fastidiosa*. который окисляется АФС и претерпевает при этом значительные конформационные изменения [1]. Мы предположили, что в химерной конструкции конформационные перестройки сенсорного домена приведут к изменению конформации флуоресцентного белка, что отразится на его флуоресцентных свойствах. В белке BigR были выбраны участки, которые на основе моделей трехмерных структур (PDB ID: 3PQJ, 3PQK) обладают выраженными изменениями в двугранных углах основной цепи при окислении. На уровне гена мы интегрировали последовательность флуоресцентного белка в структуру BigR с различными N- и C-линкерами, всего было получено 42 молекулярно-генетические конструкции. В результате была отобрана конструкция BigR-cpYFP, которая демонстрирует наиболее выраженное изменение флуоресцентного сигнала при добавке аналита – тетрасульфида натрия Na_2S_4 до концентрации 100 μM. Сигнал изменяется рациометрически: в спектре возбуждения флуоресценции (λ_{em}=530 нм) флуоресценция в пике 400 нм снижается, в пике 494 нм повышается, что приводит к изменению сигнала в 2 раза (100%). Был получен очищенный препарат белка BigR-cpYFP, он демонстрировал рациометрический ответ в 360% на насыщающую добавку Na_2S_4, и не демонстрировал изменения флуоресцентного сигнала при добавлении распространенных в клетке окислителей: H_2O_2, HOCl, GSSG, NO, $O_2^{\cdot-}$ и др. Биосенсор был проэкспрессирован в клетках линии HeLa Kyoto, обладал выраженной флуоресценцией, не демонстрировал цитотоксичности и рациометрически изменял сигнал при добавке неорганических полисульфидов с различной длиной цепи (2-4).

Литература
1. de Lira, N.P.V., Pauletti, B.A., Marques, A.C. et al. *Sci Rep,* 2018, **8**, 3508 (2018).

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 22-15-00299.

РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫХ ТИОЭФИРОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ АЦИЛ-КОА

Рапота Д.Д.,[а] Судоплатов М.А.,[б] Билан Д.С.[а,б]

[а] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, Миклухо-Маклая, 16/10,
e-mail: dianarapota7@gmail.com
[б] Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, 117997, Москва, Островитянова, 1

Тиоэфиры длинноцепочечных жирных кислот и кофермента А (ацил-КоА) – ключевые участники метаболизма липидов и сигнальных путей клеток. Однако на сегодняшний день изучение данных соединений *in vivo* затруднено из-за ограниченного набора методов их визуализации [1]. Цель данной работы – создание генетически кодируемого флуоресцентного биосенсора на основе кругового пермутанта желтого флуоресцентного белка cpYFP (circularly permuted fluorescent protein) и ацил-КоА-связывающего транскрипционного фактора FadR из *V.cholerae* [2], которой позволит исследовать пространственно-временную динамику длинноцепочечных ацил-КоА в живых клетках.

Первичная версия биосенсора была получена путем интеграции cpYFP в структуру *vc*FadR. Сайт для встраивания cpYFP находился в непосредственной близости с наиболее конформационно-лабильным участком в структуре белка *vc*FadR. Для оптимизации оптических свойств первичной версии биосенсора был проведен случайный мутагенез по всей длине гена и скрининг полученных мутантных версий биосенсора. В результате была отобрана конструкция, отличающаяся повышенной яркостью флуоресценции и амплитудой ответа на олеил-КоА и пальмитоил-КоА. Данная улучшенная версия биосенсора на длинноцепочечные ацил-КоА получила название Loci (от Long-chain indicator).

Свойства биосенсора Loci были исследованы на очищенном препарате белка и при экспрессии в культуре эукариотических клеток линии HEK 293T. Разработанный инструмент обладает рациометрическим, интенсивным и обратимым флуоресцентным сигналом к длинноцепочечным ацил-КоА. На очищенном препарате белка Loci демонстрирует высокую амплитуду ответа к целевым лигандам (A_{max} (олеил-КоА) = 18.5, A_{max} (пальмитоил-КоА) = 16.0, A_{max} (миристоил-КоА) = 13.5). В отличие от большинства сенсоров на основе cpYFP, сигнал Loci отличается относительной pH-стабильностью в физиологическом диапазоне pH (при pH от 6.5 до 8.0 сигнал меняется в ~ 1.6 раз). Помимо этого, Loci имеет низкую K_d' (порядка сотен нМ к различным лигандам) и высокую селективность к длинноцепочечным ацил-КоА, за исключением чувствительности к олеиновой кислоте.

Таким образом, был получен высокочувствительный флуоресцентный биосенсор, который в будущем позволит изучать динамику длинноцепочечных ацил-КоА в режиме реального времени *in vivo*.

Литература

1. Færgeman, N. J. & Knudsen, J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochemical Journal* **323**, 1–12 (1997).
2. Shi, W. *et al.* The 40-residue insertion in Vibrio cholerae FadR facilitates binding of an additional fatty acyl-CoA ligand. *Nat Commun* **6**, 6032 (2015).

ИНДИВИДУАЛЬНОЕ И СОЧЕТАННОЕ ВЛИЯНИЕ ЗАРЯЖЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ И ГЛИЦИНА НА ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ЛИЗИС БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI* ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ И КУРИНЫМ ЛИЗОЦИМОМ

Растрига Н.В., Климов Д.А., Гасанова Д.А., Левашов П.А.

МГУ им М.В. Ломоносова, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д.1,
e-mail: nicolos@live.ru

С каждым годом во всём мире всё больше обостряется проблема появления новых штаммов бактерий, устойчивых к антибиотикам. В связи с этим крайне актуальным является поиск новых антибактериальных средств, альтернативных антибиотикам. В качестве средств, способных заменить антибиотики могут выступать бактериолитические ферменты, в частности лизоцим, который уже широко применяется в медицине и биотехнологии [1]. Кроме того собственный лизоцим человека – это ключевой фактор иммунитета, присутствующий в организме как в свободной форме, так и в лизосомах фагоцитирующих иммунных клеток [2]. Недавно было обнаружено, что свободные заряженные аминокислоты и глицин могут существенно усиливать антибактериальное действие лизоцима по отношению к грамотрицательным бактериям [3]. Однако до сих пор не было изучено возможное сочетанное действие нескольких аминокислот на активность лизоцима. Также не было известно, как отличается эффект активации свободными аминокислотами куриного лизоцима в составе фармацевтических препаратов от эффекта активации собственного лизоцима в организме человека. Данная работа посвящена подробному изучению влияния различных сочетаний заряженных аминокислот и глицина на ферментативный лизис бактерий *Escherichia coli* куриным и человеческим лизоцимом при разной ионной силе и pH среды. В результате исследования показано, что совместное влияние заряженных аминокислот и глицина в их смесях может кратно превосходить индивидуальные активирующие эффекты. Наиболее выраженные эффекты обнаружились в присутствии смеси глутамата, аргинина и гистидина для человеческого лизоцима и смеси лизина, аргинина и гистидина для куриного лизоцима. В присутствии тройной смеси по 5 мМ каждой свободной аминокислоты наблюдалась активация лизоцима до 5-6 раз в условиях, близких к физиологическим, и до 10 раз при малой ионной силе в слабощелочной среде (10 мМ NaCl, pH = 8,5). Возможность активации лизоцима в присутствии свободных аминокислот открывает принципиально новые возможности в разработке новых высокоэффективных медицинских препаратов на основе лизоцима и препаратов, активирующих собственный лизоцим в организме.

Литература
1. Öhlknecht C., et al. // *Biotechnol. Bioeng.,* 2017, **114**, 416.
2. Hanstock H.G., et al. // *Front. Immunol.*, 2019, **10 (1178)**, 1.
3. Levashov P.A., et al. // *FEBS Open Bio*, 2019, **9 (3)**, 510.

Работа выполнена в МГУ имени М.В. Ломоносова в рамках государственного задания «Молекулярный дизайн, структурно функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды». Номер ЦИТИС: 1210415000039-8.

РЕПАРАЦИОННЫЕ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ β И λ: ФУНКЦИИ И РЕГУЛЯЦИЯ

Речкунова Н.И., Мальцева Е.А., Лебедева Н.А., Жданова П.В., Коваль В.В., Лаврик О.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, проспект Лаврентьева, 8
e-mail:nadyarec@niboch.nsc.ru

ДНК-полимеразы β (Polβ) и λ (Polλ) относятся к одному структурному X-семейству. Оба фермента обладают активностями, необходимыми для репаративного синтеза: катализируют синтез ДНК в бреши, в том числе на поврежденных матрицах, обладают 5′-dRP-лиазной активностью, а также способны вести синтез с вытеснением цепи [1]. ДНК-полимераза β признана центральной в процессе заполнения однонуклеотидной бреши, возникающей в процессе эксцизионной репарации оснований (BER), а роль Polλ в этом процессе так и остается не до конца выясненной.

Оба фермента способны катализировать синтез ДНК на структурах, содержащих разрыв и объемное повреждение – производное бенз[а]пирена (BPDE-dG) в противоположной цепи. Эффективность и точность репарационного синтеза в брешах, катализируемого Polβ и λ, зависели от конформации BPDE-dG и его положения относительно бреши. Показано, что Polλ селективно включает комплементарный dCTP только напротив *cis*-BPDE-dG, тогда как Polβ встраивает как правильный, так и ошибочные нуклеотиды напротив обоих изомеров [2]. Анализ молекулярной динамики ДНК-белковых комплексов позволил выявить структурные особенности комплекса Polλ с ДНК, содержащей однонуклеотидную брешь напротив *cis*-BPDE-dG, обеспечивающие селективность фермента в отношении этого конформера [3].

Проведен анализ влияния мультифункциональных белков – поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 (PARP1) и репликативного белка А (RPA) на активность Polβ и Polλ в коротко- и длиннозаплаточных путях BER. PARP1 ингибировал активность обеих полимераз, эффект зависел как от полимеразы, так и от ее концентрации. В условиях встраивания одного нуклеотида наблюдалось практически полное ингибирование Polβ, тогда как при более высокой концентрации полимеразы PARP1 подавлял только синтез с вытеснением цепи и практически не влиял на встраивание первого нуклеотида. В случае Polλ наблюдалось практически полное ингибирование не только синтеза с вытеснением цепи, но и включения нуклеотида в брешь. В присутствии NAD^+ ингибирующий эффект PARP1 значительно снижался, особенно в случае реакции заполнения бреши, катализируемой Polλ. Добавление в реакционные смеси RPA также приводило к разным эффектам – при низкой концентрации полимераз RPA стимулировал их активность, а при высокой – ингибировал. Таким образом, активность репарационных ДНК-полимераз β и λ может модулироваться белками PARP1 и RPA в зависимости от соотношения концентраций этих белков.

Литература
[1] Belousova E.A., Lavrik O.I. *DNA Repair*, 2015, **29**, 112.
[2] Starostenko L.V., Rechkunova N.I., Lebedeva N.A., Kolbanovskiy A., Geacintov N.E., Lavrik O.I. *DNA Repair*, 2014, **24**, 1.
[3] Rechkunova N.I., Zhdanova P.V., Lebedeva N.A., Maltseva E.A., Koval V.V., Lavrik O.I. *DNA Repair*, 2022, **116**, 103353.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 21-64-00017.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ

Родина Е.В.,[а] Курилова С.А.,[б] Безпалая Е.Ю.,[а] Воробьева Н.Н.[б]

[а]Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, e-mail: rodina@belozersky.msu.ru
[б]НИИ ФХБ МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1

Мутации в гене *ppa2*, кодирующем митохондриальную неорганическую пирофосфатазу (митPPазу), приводят к серьезным дисфункциям митохондрий у дрожжей [1] и вызывают летальные патологии у человека [2]. Это показывает, что митPPаза играет ключевую роль в работе митохондрий. Как именно это происходит и каким образом природные мутации в гене *ppa2* нарушают структуру и функцию митPPазы, пока не выяснено. Настоящая работа направлена на выяснение молекулярных основ этих явлений.

Объектами работы являются митPPазы человека и дрожжей *Ogataea parapolymorpha* (Op-PPA2). Гомологичным моделированием были получены пространственные структуры этих ферментов и их патогенных мутантных вариантов. Исследована регуляция каталитической активности Op-PPA2 под действием митохондриальных метаболитов; обнаружено активирующее влияние ATP и NADH, а также ингибирующее влияние некоторых метаболитов на Op-PPA2. Молекулярный докинг эффекторов в пространственную структуру Op-PPA2 позволил предположить возможную взаимосвязь между регуляцией активности и олигомерным равновесием Op-PPA2. Показано, что диссоциация димера Op-PPA2 на мономеры сопровождается значительным снижением каталитической активности. Сравнительный анализ результатов симуляции молекулярной динамики мономерной и димерной форм Op-PPA2 позволяет высказать предположение, что более низкая активность мономера может быть связана с неоптимальной конфигурацией активирующих ионов магния при образовании каталитически компетентного фермент-субстратного комплекса.

Для выяснения возможных причин снижения функциональности патогенных мутантных вариантов митPPазы была проведена симуляция молекулярной динамики на структурах митPPазы человека и ее патогенных мутантных вариантов S61F, M94V, M106I, E172K, Q294P. Для мутантного варианта M94V результаты такого анализа позволяют предсказать значительное снижение сродства к активаторным ионам магния. Были охарактеризованы мутантные варианты Op-PPA2 с заменами, гомологичными патогенным мутантным вариантам митPPазы человека. Вариант с заменой M52V, гомологичной M94V человека, в подтверждение теоретического анализа, характеризуется значительным снижением сродства к активаторным ионам магния и, как следствие, низкой каталитической активностью в физиологических условиях.

Литература
1. Lundin M., Baltscheffsky H., Ronne H. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, **266**, 12168.
2. Guimier A., Gordon C.T., Godard F., Ravenscroft G., Oufadem M., Vasnier C., Rambaud C., Nitschke P., Bole-Feysot C., Masson C., Dauger S., Longman C., Laing N.G., Kugener B., Bonnet D., Bouvagnet P., Di Filippo S., Probst V., Redon R., Charron P., Rötig A., Lyonnet S., Dautant A., de Pontual L., di Rago J.P., Delahodde A., Amiel J. *American Journal of Human Genetics*, 2016, **99**, 666.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 23-24-00177.

НОВЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

Рожкова А.М.[1,2], **Кислицин В.Ю.**[2], **Чулкин А.М.**[2], **Синельников И.Г.**[2], **Шашков И.А.**[2], **Сатрутдинов А.Д.**[2], **Синицын А.П.** [1,2]

[1]*Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Ленинские горы, 1-11Б*
[2]*ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Ленинский пр-т, 33-2*
amrojkova@mail.ru

Современный метод геномного редактирования CRISPR/CAS9 позволяет быстро и точно корректировать генетический материал микроорганизмов, в том числе мицелиальных грибов, что дает возможность изучать молекулярные механизмы экспрессии генов, определять роль различных транскрипционных факторов, а также получать новые микроорганизмы с заданными свойствами. [1]

В Лаборатории биотехнологии ферментов ведутся систематические исследования мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* - продуцента ключевых ферментов целлюлолитического комплекса: целлобиогидролазы I (ЦБГI), 1,4-β-глюканазы II (ЭГII) и β-глюкозидазы (БГЛ). Синергетическое действие ЦБГI , ЭГII и БГЛ обеспечивает эффективный гидролиз целлюлозосодержащих материалов (ЦСМ).

P. verruculosum характеризуется высокой продуктивностью (до 50-60 г/л) по белку, низкой собственной протеолитической активностью и незначительным уровнем производимых токсинов, что делает данный гриб платформой при разработке ферментных препаратов (ФП) на его основе. [2]

Экспрессионная система *P. verruculosum* основана на использовании сильного индуцибельного промотора гена *cbh1*, кодирующего основную целлюлазу – ЦБГI. Однако ранее было замечено, что в ряде случаев при получении продуцентов (β-глюкозидазы, ксиланазы и тд) под контролем *cbh1* промотора продуктивность рекомбинантных штаммов снижается. Кроме того, снижается и уровень ЦБГI, что приводит к ухудшению гидролитической способности ферментных препаратов (ФП) по отношению к (ЦСМ). Предполагается, что причина снижения продуктивности состоит в недостатке транскрипционных факторов (ТФ), регулирующих транскрипцию целевых генов под контролем *cbh1* промотора.

Был клонирован ген *tacA,* кодирующий фактор транскрипции целлюлаз TacA. Методом CRISPR/CAS9 был проведен нокаут гена *tacA* и изучена транскрипция генов *cbh1*, *egl2* и *bgl1*, кодирующие ЦБГI, ЭГII и БГЛ, соответственно. Показано, что транскрипционный фактор TacA в грибе *P. verruculosum* B1-221-151 (ВКМ F-3972) является репрессором целлюлаз и его нокаут приводит к резкому росту уровня транскрипции гена *cbh1* через 2 ч после начала индукции целлобиозой, целлотриозой и гентиобиозой. При культивировании штамма *P. verruculosum* ΔtacA в стандартных ферментационных условиях активность ферментного комплекса и продуктивность штамма достигала максимума к 96 ч культивирования, что позволяет сократить время ферментации производственного штамма *P. verruculosum* на 48 ч

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (#22-24-00997).

Т-КЛЕТОЧНЫЙ И ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ ПРИ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ SARS-COV-2

Рубцов Ю.П.

Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН
117997, Москва, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,
e-mail: yrubtsov@gmail.com

Во время продолжающейся пандемии коронавирусной болезни 2019 года (COVID-19) многие люди были инфицированы вирусом и вылечились от него, выработав вирус-специфические антитела и эффекторные Т-клетки памяти. Важный вопрос, оставшийся без ответа, заключается в том, какие уровни Т-клеточного ответа и ответа антител достаточны для защиты от инфекции. В докладе представлены результаты исследования по оценке уровня иммунного ответа модельных животных иммунизированных отечественным прототипом мРНК вакцины, а также у пациентов, перенесших COVID-19. Мы оценили фракции вирус-специфических CD4+ и CD8+ Т-клеток с использованием внутриклеточного окрашивания IFN-γ и интерлейкина 2 с последующей проточной цитометрией. Для пациентов, перенесших COVID-19 мы проанализировали показатели COVID-19 в зависимости от оцененных ответов антител и Т-клеток, используя метод оценки Каплана-Мейера, в течение 300 дней после включения.

Мы показали, что ответы Т-клеток и антител тесно взаимосвязаны и обычно индуцируются одновременно. Величины обоих ответов обратно коррелировали с вероятностью заражения. Лица с положительным результатом на оба ответа продемонстрировали самый высокий уровень защиты от инфекции SARS-CoV-2. Сопоставимый уровень защиты был обнаружен только у лиц с ответом антител, тогда как ответ Т-клеток сам по себе обеспечивал только промежуточную защиту.

Мы обнаружили, что вклад вирус-специфических антител в защиту от инфекции SARS-CoV-2 более выражен, чем вклад Т-клеток. Данные о титрах вирусспецифических IgG могут быть полезны для принятия решений в области персонализированного здравоохранения и государственной политики по борьбе с COVID-19.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, Соглашение № 075-15-2021-1049.

СТИМУЛЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МИКРОГЕЛИ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ И КОНСТРУИРОВАНИЯ БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ

Рудаков Н.С.,[а,б] Пергушов Д.В.,[а] Сиголаева Л.В.[а]

[а]Химический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы 1/3, e-mail: n.s.rudakov@yandex.ru
[б]Факультет наук о материалах Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы 1/73

(Со)полимерные стимулчувствительные микрогели являются вместительными контейнерами для недеструктивной иммобилизации биомолекул (например, ферментов), обеспечивая им высокогидратированное микроокружение, которое способствует сохранению биологической активности и функций. Способность подобных микрогелей изменять свой гидрофильно-гидрофобный баланс в зависимости от условий окружающей среды (температура, pH, состав растворителя) позволяет им легко адаптироваться к поверхностям различной природы, что представляет значительный интерес для конструирования (био)сенсоров.

В данной работе методами пьезоэлектрического микровзвешивания с мониторингом диссипации и атомно-силовой микроскопии проведено исследование формирования и свойств микрогелевых и микрогель-ферментных покрытий и выявлены влияющие на них факторы. В качестве микрогеля был использован pH- и термочувствительный микрогель на основе *N*-изопропилакриламида и диметиламинопропилметакриламида (катионный сомономер), а в качестве фермента – глюкозооксидаза. Формирование микрогелевого покрытия проводили путем адсорбции микрогеля в незаряженном состоянии (pH 9.5), а последующее связывание полученным покрытием глюкозооксидазы – при pH 7, при котором микрогель заряжен положительно, а фермент (pI 4.3) обладает суммарным отрицательным зарядом (электростатическая иммобилизация). Обнаружено, что при pH 9.5 микрогель хорошо адсорбируется и прочно удерживается на относительно гидрофобной, модельной (золотой) поверхности, сохраняя свои стимулчувствительные свойства. Установлено, что при pH 7 частицы адсорбированного микрогеля способны связывать значительные количества глюкозооксидазы, не десорбируясь в результате взаимодействия с ферментом.

Для создания биосенсорной системы на глюкозу использовали планарные графитовые электроды, модифицированные наночастицами диоксида марганца (медиатор), на поверхность которых последовательно наносили (адсорбция) сначала микрогель при pH 9.5, а затем глюкозооксидазу при pH 7. Показано, что полученная биосенсорная система обладает хорошими аналитическими характеристиками (чувствительность, предел обнаружения и предел количественного определения составляют $3{,}1 \cdot 10^{-3}$ $A \cdot M^{-1} \cdot см^{-2}$, 5 μM и 17 μM соответственно), широким линейным диапазоном при измерении глюкозы (7 – 3000 μM), а также высокой операционной стабильностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 22-24-00424.

ВЛИЯНИЕ G-КВАДРУПЛЕКСНОЙ СТРУКТУРЫ ПРОМОТОРА ГЕНА *HTERT* НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ

Савицкая В.Ю.[1], Новоселов К.А. [1], Сныга В.Г. [1], Дятлова Е.А.[2], Ерошенко Д.А.[2], Долинная Н.Г. [1], Жарков Д.О.[2], Кубарева Е.А.[1], Зверева М.Э.[1]

[1]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1
svk1896@mail.ru
[2]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д. 8

Обратная транскриптаза человека (*hTERT*) – фермент, активный в стволовых, половых и раковых клетках, поддерживающий длину теломерных повторов. Мутации в промоторе гена *hTERT* встречаются при множественных видах рака и часто представлены заменами G>A матричной цепи в позициях 124, 146 и двойной заменой 138/139 относительно стартового кодона. Полагают, что данные мутации образуют сайт связывания факторов семейства ETS, действие которых повышает экспрессию гена *hTERT*. Рассматриваемый участок некодирующей цепи промотора *hTERT* имеет G-богатую последовательность, которая в определенных условиях может формировать три последовательно расположенных параллельных G-квадруплекса (G4) [1].

Наиболее распространенное повреждение dG - 8-оксо-2'-дезоксигуанозин (8-oxoG) репарируется с помощью ферментов эксцизионной репарации оснований (BER). 8-Оксо-ДНК-гликозилаза (OGG1) узнает и удаляет 8-oxoG с образованием апурин-апиримидинового (AP) сайта, который подвергается действию AP-эндонуклеазы (APE1). Мы предположили, что закрепление описанных неудаляемых тканеспецифичных мутаций может быть результатом снижения эффективности работы ферментов BER в области G4. Для проверки этой гипотезы было изучено взаимодействие ферментов APE1 и OGG1 человека с модельными фрагментами промотора *hTERT*, содержащими замены G>X (где X – 1,2-дидезоксирибоза (THF), устойчивый к спонтанному β-элиминированию аналог AP-сайта или 8-oxoG) в различных положениях, соответствующих "драйверным" мутациям.

В первую очередь мы определили влияние положения замен G>X в матричной цепи промотора *hTERT* на гидролитическую активность APE1 и OGG1 в условиях формирования G4. Эффективность удаления модификации зависела от ее положения в G-трактах: хуже всего расщеплялись модификации в позициях 124 и 146, в которых наиболее часто встречаются мутации при онкологических заболеваниях. Присутствие C-богатой цепи, комплементарной к матричной цепи промотора *hTERT*, увеличивало гидролитическую активность APE1: независимо от ионной силы, наличия и положения модификации репарация THF происходила эффективно. С другой стороны, эффективность удаления 8-oxoгуанина в присутствии комплементарной цепи белком OGG1 по-прежнему была понижена в положениях 124 и 146.

Таким образом, на репарацию повреждений в матричной цепи промотора гена *hTERT* белком APE1 значительным образом влияет наличие G4, тогда как эффективность удаления повреждений белком OGG1, по всей видимости, зависит от нуклеотидного окружения 8-oxoG. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что закрепление мутаций в позициях 124 и 146 относительно стартового кодона, может быть результатом сниженной эффективности работы системы BER.

Литература
Pavlova A. V. *et. al.* G-Quadruplex Formed by the Promoter Region of the hTERT Gene: Structure-Driven Effects on DNA Mismatch Repair Functions. Biomedicines. 2022, **10,** 1871.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 21-14-00161).

СОЗДАНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРА С ВЫСОКОЙ АСПАРТАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Самарин А.А.,[а] Синолицкий М.К.,[б] Дербиков Д.Д.,[а] Яненко А.С.[а]

[а] НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский Геномный центр, Москва, Россия, 113545, Москва, 1-ый Дорожный пр., 1, e-mail: yanenko@genetika.ru
[б] АО «Биоамид», 410033, Саратовская обл, г. Саратов, ул. Международная, д. 27 e-mail: bioamid@yandex.ru

L-аспарагиновая кислота используется для производства кормовых премиксов, удобрений и медицинских препаратов [1]. В промышленности аспарагиновую кислоту получают биокаталитическим методом из фумаровой кислоты. В этом процессе участвуют генетически изменённые клетки *E. coli*, сверхсинтезирующие фермент L-аспартат-аммоний-лиазу (аспартазу) [2]. Нежелательным побочным продуктом в этом процессе является яблочная кислота, образующаяся при присоединении воды к двойной связи фумарата под воздействием ферментов фумараз [3]. Поэтому для совершенствования технологии требуется как повышения удельной активности биокатализатора, так и снижения концентрации побочных продуктов.

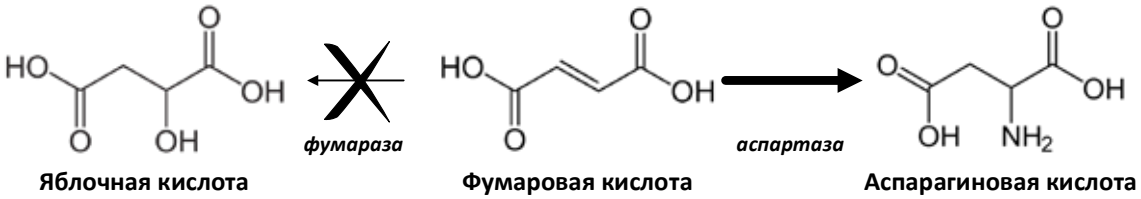


Рисунок 1. *Основная и побочная реакции при получения L-аспарагиновой кислоты*

Для повышения удельной активности была произведена замена природного промотора гена аспартазы *aspA* в хромосоме *E. coli* на промотор P_{j23119}. Удельная аспартазная активность клеток возросла в 3.5 раза, с 40 до 140 ед. актив. Для снижения побочной активности были удалены гены фумараз *fumA* и *fumC*, что снизило фумаразную активность с 1,5-2,8 ед. актив. до 0.

Проверку технологических свойств нового биокатализатора (БК) проводили с помощью клеток, иммобилизованных совместной сшивкой глутаровым альдегидом в полиэтиленимине. Полученный БК не продуцирует яблочную кислоту, обладает повышенной в 2,4 раза удельной аспартазной активностью по сравнению с исходным БК, продуктивностью около 6500 кг аспарагината на кг и временем работы БК до 365 суток.

На основе нового БК разработана усовершенствованная технология получения L-аспарагиновой кислоты, которая в настоящее время внедрена на производстве у одного из отечественных лидеров в биокаталитических технологиях - АО «Биоамид».

Литература
Fibriansah G., Veetil V. P., Poelarends G. J., Thunnissen A. M. W. H., Biochemistry 2011, 50, 6053–6062.
De Villiers M., Veetil V. P., Raj H., De Villiers J., Poelarends G. J., ACS Chem. Biol. 2012, 7, 1618–1628.
Tajima T., Hamada M., Nakashimada Y., Kato J. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Volume 42, Issue 10, 1 October 2015, Pages 1319–1324

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного Задания НИЦ «Курчатовский институт» (номер АААА-А20-120093090015-2 от 30.09.2020).

СИСТЕМА ГОМОГЕННОЙ ДЕТЕКЦИЯ АФЛАТОКСИНА B1 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ И РЕГИСТРАЦИЕЙ АНИЗОТРОПИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Самохвалов А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН,
Ленинский проспект, 119071, Москва;
03alexeysamohvalov09@gmail.com

Аптамеры, олигонуклеотидные рецепторные молекулы, интенсивно используются для определения широкого круга соединений. Не уступая антителам по аффинности и селективности, аптамеры имеют ряд преимуществ: простая и легко модифицируемая функциональными группами структура, получение химическим синтезом, высокая стабильность в различных средах и возможность многократной ренатурации. В последнее время активно разрабатываются биоаналитические системы, основанные на применении комплементарных аптамерам коротких одноцепочечных нуклеиновых кислот (оцНК), в частности, на препятствовании детектируемым лигандом образования комплексов аптамер–оцНК. Ранее эти процессы и их зависимость от локализации и протяженности участка взаимодействия с оцНК были описаны нами для G-квадруплексного аптамера к охратоксину А [1]. В настоящей работе изучались аналогичные системы с участием дуплексного (шпилечного) аптамера к другому низкомолекулярному токсиканту – афлатоксину В1 (АФВ1) для оценки общности выявленных закономерностей.

Было получено флуоресцентное производное АФВ1, меченное флуоресцеинтиокарбамил этилендиамином. Методом, основанным на регистрации анизотропии флуоресценции [2], определены константы взаимодействия меченого АФВ1 и отличающихся по длине аптамеров, специфичных к АФВ1 – 22, 26, 32, 38, 42, 46 и 54 нуклеотида. 26-звенный ДНК аптамер 5′-CAC GTG TTG TCT CTC TGT GTC TCG TG-3′(константа диссоциации комплекса с меченым АФВ1 – 190±60 нМ) выбран для реализации гомогенного анализа. Использовали комплементарную короткую оцДНК, меченную флуоресцеином, – FAM-CA CGA GAC ACA, которая образует 31 водородную связь с аптамером. Определен оптимальный состав буфера для проведения анализа: 20 мМ Трис-ацетат, 100 мМ натрий ацетат, 20 мМ магний ацетат, pH 8.5. оцДНК в отсутствие АФВ1 связана с аптамером, а в присутствии – находится в свободном состоянии.

К пробе, содержащей АФВ1, последовательно добавляются меченый олигонуклеотид и аптамер. Реакционная смесь облучается плоскополяризованным светом и регистрируется анизотропия флуоресценции (λex = 482 нм / λem = 520 нм), величина которой определяется соотношением свободной и связанной форм оцДНК и отражает содержание АФВ1 в пробе. В выбранных условиях предел обнаружения АФВ1 составляет 20±8 нМ, продолжительность тестирования – 5 мин. Важным преимуществами предложенного подхода являются простое проведение тестирования и быстрое получение результатов.

Литература
1. Samokhvalov A.V., Safenkova I.V., Eremin S.A., Bonchuk A.N., Maksimenko O.G., Sluchanko N.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., *Intern. J. Mol. Sci.*, 2022, **23** (9), article 4876.
2. Samokhvalov A.V., Safenkova I.V., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., *Anal. Chem.*, 2018, **90** (15), 9189–9198.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант 23-46-00108.

РАЗРАБОТКА НОВЫХ БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ КОМБИНАЦИИ ИЗОТЕРМИЧЕСКИХ АМПЛИФИКАЦИЙ И ВЫЯВЛЕНИЯ ИХ ПРОДУКТОВ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-ПОЛОСОК

Сафенкова И.В.,[а] Иванов А.В.,[а] Буркин К.М.,[а,б] Жердев А.В.,[а] Дзантиев Б.Б.[а]

[а]Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071, Москва, Ленинский проспект 33,
e-mail: irina.safenkova@gmail.com
[б]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, стр. 1

Биосенсорные системы, обеспечивающие выявление аналитов с высокой чувствительностью, востребованы для решения многих практически значимых задач. Как правило, детекция очень низких концентраций аналита обеспечивается использованием сложного и дорогостоящего стационарного оборудования. Биосенсорные системы, основанные на изотермических амплификациях (рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA), петлевая изотермическая амплификация (LAMP), CRISPR/Cas амплификация и др.), являются перспективным инструментом, минимизирующим указанные выше недостатки. Продукты амплификаций – двуцепочечные ДНК-ампликоны для РПА и LAMP или одноцепочечные ДНК- или РНК-зонды, расщепленные активированной эндонуклеазой Cas. Для их детекции используют электрофорез, регистрацию флуоресценции, мембранные тесты и другие подходы. Целью нашего исследования являлась разработка и характеристика комбинированных аналитических систем, объединяющих изотермические амплификации с простыми внелабораторными средствами детекции их продуктов – иммунохроматографическими тестами (ИХТ).

Разработаны аналитические системы с четырьмя перспективными сочетаниями подходов: RPA–ИХТ, LAMP–ИХТ, RPA–CRISPR/Cas12a, LAMP–CRISPR/Cas12a. Выявляемым объектом для всех аналитических систем был фитопатоген *Erwinia amylovora* – возбудитель бактериального ожога, что позволило впервые экспериментально сравнить четыре подхода для одного аналита. Предел обнаружения составил 10^4 КОЕ/мл для LAMP–ИХТ, 10^3 КОЕ/мл для LAMP–CRISPR/Cas и 10^2 КОЕ/мл для RPA–ИХТ и RPA–CRISPR/Cas. На панели реальных проб (17 образцов с симптомами болезни и без) результаты, получаемые для четырех разработанных систем, были сопоставлены с данными ПЦР. Разработанные тесты на основе RPA, LAMP, CRISPR/Cas12a и ИХТ показали эффективное обнаружение клеток *E. amylovora* в течение 30–55 мин. Достигнутая высокая чувствительность позволяет диагностировать бессимптомное развитие болезни. Отметим, что при использовании ИХТ аналитические системы пригодны для применения во внелабораторных условиях. Внедрение предложенных систем в практику обеспечит информативную диагностику бактериального ожога и мониторинг распространения этого заболевания.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-318 от 20.04.2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

СТИМУЛЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МИКРОГЕЛИ И ФЕРМЕНТЫ: ПЕРСПЕКТИВНЫЙ АЛЬЯНС ДЛЯ СОЗДАНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ

Сиголаева Л.В.,[а] Пергушов Д.В.,[а] Курочкин И.Н.[а,б]

[а]Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы 1/3, e-mail: lsigolaeva@belozersky.msu.ru
[б]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии Наук, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

Повышение эффективности иммобилизации ферментов является ключевой задачей при конструировании ферментных биосенсорных систем. В качестве матриц для недеструктивной иммобилизации ферментов широко применяются полимеры. Особенно интересными полимерными объектами являются стимулчувствительные сополимерные микрогели на основе поли-*N*-изопропилакриламида (ПНИПАМ), которые обладают двойной стимулчувствительностью (pH- и термочувствительностью) и могут служить высокоемкими контейнерами для иммобилизации ферментов, обеспечивая благоприятное высокогидратированное микроокружение.

Данная работа демонстрирует достоинства и преимущества стимулчувствительных микрогелей для модификации поверхностей и создания на их основе ферментных биосенсорных систем. В частности в работе экспериментально показано, как можно использовать стимулчувствительные свойства микрогелей для повышения эффективности адсорбции микрогелей на твердые (проводящие) поверхности, контроля количества и пространственного расположения включаемых в адсорбированные микрогели ферментов, дизайна поверхности ферментных биосенсоров и, наконец, регуляции активности ферментов, иммобилизованных в микрогелевую матрицу, способную изменять свои свойства при воздействии внешнего стимула [1-6].

Литература
1. Sigolaeva L.V., Gladyr S.Yu., Gelissen A.P.H., Mergel O., Pergushov D.V., Kurochkin I.N., Plamper F.A., Richtering W. *Biomacromolecules*, 2014, **5**, 3735.
2. Sigolaeva L.V., Mergel O., Evtushenko E.G., Gladyr S.Yu., Gelissen A.P.H., Pergushov D.V., Kurochkin I.N., Plamper F.A., Richtering W. *Langmuir*, 2015, **31**, 13029.
3. Sigolaeva L.V., Gladyr S.Yu., Mergel O., Gelissen A.P.H., Noyong M., Simon U., Pergushov D.V., Kurochkin I.N., Plamper F.A., Richtering W. *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 6091.
4. Sigolaeva L.V., Pergushov D.V., Oelmann M., Schwarz S., Brugnoni M., Kurochkin I.N., Plamper F.A., Fery A., Richtering W. *Polymers*, 2018, **10**, 791.
5. Sigolaeva L.V., Pergushov D.V., Gladyr S.Yu., Kurochkin I.N., Richtering W. *Adv. Mater. Interfaces*, 2022, **9**, 2200310.
6. Sigolaeva L.V., Efremova O.V., Pergushov D.V. *Mend. Commun.*, 2023, **33** (in press).

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 22-24-00424.

ВКЛАД ЭСТЕРАЗ В ФОРМИРОВАНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ НАСЕКОМЫХ К ИНСЕКТИЦИДАМ

Силиванова Е.А., Кинарейкина А.Г., Маслакова К.Ю., Янгирова Л.Я., Шумилова П.А., Левченко М.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной энтомологии и арахнологии – филиал ТюмНЦ СО РАН, 119991, Тюмень, Институтская 2, e-mail: 11eas@vniivea.ru; sylivanovaea@mail.ru

Карбоксилэстеразы (КФ 3.1.1.x, CaE) как ферменты первой фазы детоксикации ксенобиотиков вовлечены в формирование устойчивости насекомых к инсектицидам (главным образом, карбаматам, ФОС, пиретроидам)1. У резистентных к инсектицидам насекомых, как правило, регистрируют увеличение активности CaE: например, у линий комнатной мухи *Musca domestica* L., резистентных к пиретроиду бета-циперметрину в 4-7 раз в зависимости от субстрата фермента2 и к неоникотиноиду тиаметоксаму в 1,5 раза3.

Механизм участия CaE в инсектицидной резистентности связан с увеличением уровня экспрессии генов (количественные изменения) и/или мутационными изменениями кодирующих последовательностей (качественные изменения)1. Использование разных субстратов при оценке эстеразной активности позволяет характеризовать субстратную специфичность и вклад отдельных изоформ CaE в обеспечение устойчивости. Нами оценена α-, β- и ρ-NPA-эстеразная активность у имаго *M. domestica* L. в отношении субстратов 1-нафтилацетата (α-NA), 2-нафтилацетата (β-NA) и ρ-нитрофенилацетата (ρ-NPA) соответственно. Ферментативную активность определяли у особей лабораторной линии после однократного воздействия на насекомых инсектицидом хлорфенапиром в сублетальных концентрациях (для самок – 0,025%, для самцов – 0,015%), а также у особей хлорфенапир-устойчивой линии, которая подвергалась действию инсектицида на протяжении нескольких поколений. Статистически значимые отличия ρ-NPA-эстеразной активности по полу наблюдались в контроле и после однократного воздействия инсектицидом (у самок активность в 1,6-1,7 раза выше, чем у самцов, $p < 0,05$), но не у особей хлорфенапир-устойчивой линии. У самцов *M. domestica* L. после однократного воздействия хлорфенапиром α-эстеразная активность уменьшилась в 1,69 раз ($p < 0,05$), у самок не изменилась; β-эстеразная активность увеличилась как у самок, так и у самцов в 1,87 и 1,62 раз соответственно по сравнению с контрольными особями ($p < 0,05$). Воздействие инсектицидом не повлияло на активность эстеразы насекомых в отношении ρ-NPA. У самок и самцов хлорфенапир-устойчивой линии (22 поколение) α-эстеразная активность была выше в 1,73 и 1,85 раз соответственно ($p < 0,05$), а β- и ρ-NPA-эстеразная активность оставалась на том же уровне, что и у особей линии, не подвергавшейся инсектицидному действию. Полученные результаты согласуются с данными об изменении уровня экспрессии генов, кодирующих эстеразы, у самок чувствительной и резистентной к пиретроидам линий *M. domestica* L.4

Литература
1. Li X., Schuler M.A., Berenbaum M.R. *Annu Rev Entomol*, 2007, **52**, 231-53.
2. Zhang L., Gao X., Liang P. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2007, **89(1)**, 65-72.
3. Khan H.A.A., Akram W., Iqbal J., Naeem - Ullah U. *PLoS ONE*, 2015, **10(5)**, e0125850.
4. Feng X., Li M., Liu N. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, **92**, 30e39.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, проект №122122800052-9. Хлорфенапир-устойчивая линия насекомых получена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 19-016-00059.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С НОСИТЕЛЯМИ НА ОСНОВЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ

Скуредина А.А., Якупова Л.Р., Копнова Т.Ю., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Россия, г. Москва ул. Ленинские Горы, д. 1
anna.skuredina@yandex.ru

Для повышения эффективности терапевтического действия многих лекарственных молекул в качестве систем доставки препаратов используются нетоксичные биосовместимые олигосахариды циклодекстрины (ЦД), состоящие из нескольких D-глюкопиранозных звеньев. Данные молекулы являются перспективными носителями лекарств, поскольку способны включать в свою внутреннюю гидрофобную полость неполярные углеродсодержащие фрагменты молекулы «гостя», что обуславливает увеличение стабильности, растворимости и др. свойств препарата. Для направленной регуляции физико-химических свойств «гостя» было получено множество производных ЦД путем модификации гидроксильных групп, а также полимеров различного строения с использованием ЦД в качестве мономеров [1]. Однако не изучено, какой тип носителя имеет наибольшее преимущество для разработки наиболее эффективной лекарственной формы.

В данной работе рассмотрены комплексы антибактериальных молекул класса фторхинолонов с производными ЦД, а также полимерами на их основе, синтезированными с использованием в качестве линкера 1,6-гексаметилендиизоцианата (полЦД). Также были получены и лекарственные формы методом темплатного синтеза, т.е. в качестве мономера использовался комплекс ЦД-лекарство (мЦД). С помощью метода ИК-спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма показано, что полЦД в 100 раз более эффективно связывают фторхинолоны по сравнению с производными ЦД. Кроме того, полЦД способны в большей степени вызывать дефекты и нарушать целостность липидного бислоя, что было продемонстрировано на модельных клеточных мембранах – липосомах, а также замедлять кинетику высвобождения лекарственной молекулы. Важно отметить, что при инкапсуляции препарата методом темплатного синтеза наблюдается наиболее замедленная кинетика высвобождения, при этом степень выраженности эффекта напрямую зависит от степени сшивки.

Антибактериальные свойства комплексов носитель-лекарство исследованы на *E. coli* и *B. subtilis* методом диффузии в агаре и с использованием жидких сред. Установлено, что использование полимерного носителя на основе ЦД (полЦД и мЦД) способствует снижению минимальной ингибирующей концентрации фторхинолонов, однако наблюдается тенденция к пролонгированному действию, по-видимому за счет адсорбции на бактериальных клетках, что было показано микроскопическими методами. Таким образом, полЦД и мЦД способствуют более значимому изменению как физико-химических свойств, так и антибактериальной активности лекарственных молекул, т.е. являются более перспективными носителями лекарств.

Литература
1. Liu Z., Ye L., Xi J., Wang J., Feng Z. Cyclodextrin polymers: Structure, synthesis, and use as drug carriers // Progress in Polymer Science. 2021 V. 118 P. 101408.

Работа выполнена в рамках реализации гранта РНФ 22-24-00604; стипендии Президента РФ молодым учёным и аспирантам 2022-2024; с использованием оборудования по программе развития МГУ.

ГКР СПЕКТРОСКОПИЯ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЬБУМИНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Слипченко Е.А.,[а] Сафиуллин Р.Р.,[а,б] Богинская И.А.,[а] Седова М.В.,[а] Афанасьев К.Н.,[а] Рыжиков И.А.[а]

[а]Институт теоретической и прикладной электродинамики Российской академии наук, 125412, Москва, Ижорская 13, стр.6,
e-mail: slipchenko-katya@mail.ru
[б]Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141701, Московская область, Долгопрудный, Институтский переулок 9

Метод гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) успешно используется в задачах по детектированию высокомолекулярных аналитов различного типа в низких концентрациях. Одно из актуальных направлений развития метода – это количественное определение ферментов и белков. Такая задача может быть реализована с помощью специальных методов пробоподготовки: лазерного или ультразвукового воздействия, осаждении в электрическом поле и других с последующим анализом и обработкой полученных спектральных данных с применением различных математических методов на основе многопараметрической статистики.

Данная работа направлена на разработку метода количественного определения белков в водных растворах на примере альбумина на основе его ГКР спектров, электрофоретически осажденного на наноструктурированные самоорганизованные ГКР-активные подложки на основе серебра.

Раствор альбумина в деионизованной воде объемом 10 мкл с концентрацией белка 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 г/л был помещен между электродами, в качестве которых выступали ГКР-активные подложки на стеклянной основе, к которым были припаяны контакты. На сформированную таким образом ячейку подавали напряжение синусоидальной формы с амплитудой 10 В в течение 15 минут. После воздействия поля с помощью дозатора переменного объема удаляли жидкость и измеряли ГКР спектры в образовавшемся осадке с помощью спектрометра на основе конфокального микроскопа WITec на длине волны возбуждения 785 нм, мощности лазера 45 мВт и времени накопления 20 секунд.

Полученные спектры были обрезаны в спектральном диапазоне 400 – 1800 $см^{-1}$. Сглаживание выполняли с использованием фильтра Савицкого-Голая с размером окна 15 и полиномиальным порядком 3. После этого каждый спектр был нормирован к своему собственному среднему значению и стандартному отклонению. Далее была произведена еще одна нормировка на “сумму” всех значений интенсивности конкретного спектра (файла\строчки). Для построения модели калибровки была выбрана частичная регрессия наименьших квадратов.

В результате удалось построить модель со значением целевой метрики коэффициента детерминации, равной 0.96, что предоставляет возможность построения калибровочной зависимости вплоть до концентраций альбумина 0.01 г/л.

Предложенный способ пробоподготовки, в отличие от прямого высушивания проб на воздухе, в совокупности с математической обработкой дает возможность использования метода для количественного определения белка в пробе на примере альбумина в концентрационном диапазоне 0.01 – 10 г/л.

МИКРОФЛЮИДНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПРОТИВОИНФЕКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Смирнов И.В.

Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН
117997, Москва, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,
e-mail: ivansmr@inbox.ru

С развитием современных технологий стало возможно накапливать, и что самое главное оперировать огромными объемами различной информации - Big Data. В настоящее время технологии работы с Big Data находят отражение в самых различных отраслях жизни: в первую очередь в родоначальнике BigData – IT-технологиях, в финансовой сфере, промышленности, обеспечении комфортной жизни, и что особенно важно в медицине и науке.Одной из таких технологий является микрофлюидная платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биологической активности (MDE-FACS). В настоящее время существует большое количество методов, направленных на скрининг функции связывания с лигандом. Методов скрининга функциональной активности, в частности каталитической, существенно меньше.

В докладе представлена новая технология высокопроизводительного скрининга биологической активности. В наших исследованиях технология MDE-FACS была адаптирована для решения таких задач биомедицины как: скрининг и получение новых антимикробных препаратов; поиск нейтрализующих антител для терапии инфекционных заболеваний; поиск антител, способных эффективно нацеливаться на аутоиммунные и опухолевые клетки.

Технология основана на использовании природных (представители микробиоты, иммунные клетки) или искусственных клеточных библиотек (клеточный дисплей), инкапсулированных в капли биосовместимой двухкратной эмульсии, с последующим скринингом методом флуоресцентно-активированного клеточного сортинга (FACS). Для проведения скрининга в каплях подбирается высоко специфический «механизм», активируемый искомым фенотипом, представленным в клеточной библиотеке. Активированный «механизм» приводит к изменению флуоресценции, используемой в качестве аналитического сигнала. Микрофлюидная компартментализация библиотеки фенотипов вместе с «механизмом» в каплях биосовместимой эмульсии вода/масло/вода приводит множеству индивидуальных микрокомпартментов, в которых может происходить активация механизма, приводящая к изменению флуоресценции. После этого фенотипы, способные активировать «механизм» становится возможно отобрать с использованием флуоресцентно-активированного клеточного сортинга (FACS) и использовать для анализа напрямую без культивации методом широкомасштабного секвенирования, или после культивации классическими методами генотипического, фенотипического, структурного и функционального анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, Соглашение № 075-15-2021-1049.

СРАВНЕНИЕ ТРЕХ СХЕМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СЕРОДИАГНОСТИКИ COVID-19

Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН,
Ленинский проспект, д. 33, 119071, Москва, Россия
sotnikov-d-i@mail.ru

Для серодиагностики – выявления специфических антител против патогенов – востребованы простые быстрые аналитические методы. Этим условиям удовлетворяет иммунохроматография, однако сложность ее применения для серодиагностики состоит в присутствии в пробах неспецифических иммуноглобулинов, концентрация которых существенно выше, чем специфических антител. Поэтому представляет интерес выбор высокочувствительных схем иммунохроматографической серодиагностики.

В работе проведено сравнение трех схем иммунохроматографической детекции антител против возбудителя COVID-19. Состав мембранного композита для всех схем был идентичен, тогда как выбор реагента для мечения наночастицами золота, порядок взаимодействий в ходе иммунохроматографии и состав образующихся комплексов отличались. В схеме А использовали меченый иммуноглобулин-связывающий белок, а в схемах В и С – меченый антиген RBD SARS-CoV-2. В тестовой зоне иммунохроматографической тест-полоски при реализации схем А и В иммобилизовали антиген, а схемы С – иммуноглобулин-связывающий белок. Таким образом, в тестовой зоне детектировали следующие комплексы:

схема А: антиген на мембране – антитела – меченый иммуноглобулин-связывающий белок:

схема В: антиген на мембране – антитела – меченый антиген;

схема С: иммуноглобулин-связывающий белок на мембране – антитела – меченый антиген.

Общий недостаток схем А и С связан с тем, что иммуноглобулин-связывающие белки взаимодействуют со всеми иммуноглобулинами пробы. Напротив, в схеме В, использующей поливалентность антител, детектируемый комплекс формируют только специфические антитела, а остальные иммуноглобулины не влияют на результаты тестирования. Однако в схеме В возможно образование комплексов (меченый антиген – антитела – меченый антиген) в потоке, и тогда антитела в составе этих комплексов не имеют свободных валентностей для связывания в тестовой зоне, что снижает интенсивность окрашивания, особенно при низких концентрациях антител.

Были изготовлены экспериментальные образцы трех видов тест-систем, установлены оптимальные условия проведения иммунохроматографических процессов и проведено сравнение при тестировании стандартного препарата антител, панелей положительных и отрицательных сывороток. Наименьший предел детекции антител наблюдался для схемы С, когда специфические антитела взаимодействуют с меченым антигеном при движении жидкости по тест-полоске, а затем образовавшиеся иммунные комплексы связываются со стафилококковым белком А, иммобилизованным на тестовой зоне. Данная комплектация тест-системы позволяет детектировать до 10 нг/мл антител в сыворотке, обеспечивая 100%-ную диагностическую чувствительность.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Государственного фонда естественных наук Китая в рамках научного проекта № 20-58-55001.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ: ТРАДИЦИИ И НОВАЦИИ

Стойнова Н.В.

АО Научно-исследовательский институт «Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»)
г. Москва,117545, 1-ый Дорожный пр-д, д.1, корп. 1
nataliya_stoynova@agri.ru

Метаболическая инженерия, под которой понимается направленное усовершенствование образования необходимого продукта или свойств клетки путем модификации ряда присущих ей биохимических реакций (или введения новых) с использованием технологий рекомбинантных ДНК, в последние десятилетия претерпела значительные изменения. Изменения эти коснулись в первую очередь революционным образом расширившихся методологических возможностей. Неизменной осталась практическая направленность этой области научной деятельности, которая, будучи основана на фундаментальных знаниях о механизмах функционирования живой клетки, имеет целью получение именно практически значимого результата: конструирование штаммов - продуцентов востребованных химических соединений, создание промышленного процесса культивирования этих штаммов и (при необходимости) последующего выделения и очистки целевого продукта.

Можно выделить важные этапы в развитии метаболической инженерии: (i) традиционная селекция; (ii) прямая модификация конкретных метаболических путей, основанная на прецизионных генно-инженерных манипуляциях с хромосомой микроорганизма и поддерживаемая достижениями системной биологии, включающими т.н. «омиксные» технологии, искусственные системы метаболического контроля, лабораторную адаптивную эволюцию и т.д.; (iii) эра синтетической биологии, позволяющая расширить круг микробных хозяев, используемых ими субстратов и метаболических путей и, тем самым, расширить круг природных и неприродных соединений, которые могут быть получены путем микробиологического синтеза.

Одними из наиболее крупномасштабных биотехнологических процессов по сей день являются процессы получения L-аминокислот и нуклеозидов. Прогресс в микробном синтезе L-аминокислот и связанных с ними химических соединений был достигнут благодаря сочетанию традиционных стратегий с новыми подходами, среди которых (i) новые инструменты редактирования генома, основанные на системах рекомбинации бактериофагов, адаптированные для таких хорошо изученных бактерий, как *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum, Methylophilis methylotrophus*, *Bacillus* species, *Pantoea ananatis*; (ii) создание искусственных автоиндуцибельных цепей в метаболическом пути (на примере конструирования штаммов - продуцентов аминокислот с разветвленной цепью); (iii) идентификация т.н. «скрытых» метаболических потоков (на примере биосинтеза L-изолейцина); (iv) индуцибельное перенаправление потоков углерода в процессе культивирования при помощи а) ограниченного протеолиза ключевых ферментов, маркированных участками, кодируемыми транспортно-матричными РНК или б) избирательное подавление экспрессии генов; (v) кофакторная инженерия (на примере комплекса NAD(P) оксидоредуктазы I, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы и редуктоизомеразы кетокислот из *E. coli*) и другие.

КОММЕРЧЕСКИ ДОСТУПНЫЕ «МЕЧЕНЫЕ» 2’-ДЕЗОКСИУРИДИН-5’-ТРИФОСФАТЫ ДЛЯ ПРЯМОГО ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК

Супрун Е.В.[1, 2], Бибик К.В.[1, 2], Хмелёва С.А.[2], Птицын К.Г.[2], Курбатов Л.К.[2], Радько С.П.[2]

[1]ФГБОУВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова», химический факультет, Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1, 119991 Москва
[2]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», ул. Погодинская, 10, стр. 8, 119121 Москва
lenasuprun@mail.ru

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – известный биомаркер бактериального или вирусного заражения. Современные способы амплификации, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и изотермические методы, обеспечивают высокочувствительное и селективное обнаружение ДНК на уровне одной молекулы в образце. В свою очередь продукты амплификации – ДНК-ампликоны – требуют определения концентрации каким-либо физико-химическим методом. С целью разработки новых способов анализа *in situ* перспективно соединение биохимических способов амплификации ДНК с методами электрохимической регистрации образующихся ампликонов путем введения в ферментативную реакцию электроактивных «меченых» нуклеотидов [1]. Необходимость введения «меток» обусловлена недостаточной собственной электроактивностью двунитевой ДНК (днДНК) [2], структуру которой имеют большинство продуктов амплификации.

В данной работе была изучена палитра коммерчески доступных флуоресцентных «меченых» 2’-дезоксиуридин-5’-трифосфатов (дУТФ), содержащих молекулы родамина, флуоресцеина или красителя Cy5. Модифицированные дУТФ были проверены в качестве электроактивных «меток» и в роли субстратов ферментов, используемых в ПЦР и изотермической амплификации. Методами вольтамперометрии на печатных графитовых электродах были изучены реакции окисления и восстановления всех свободных «меток» и «меченых» ими дУТФ. Проведено сравнение характеристик полученных электрохимических сигналов. В отличие от родамина, для флуоресцеина и Cy5 показана возможность встраивания производных дУТФ в днДНК с высокой степенью замещения природных 2’-дезокситимидин-5›-трифосфатов в смеси (до 80 %). Наработанные «меченые» днДНК-ампликоны были определены в микромолярных концентрациях путем окисления или восстановления соответствующих «меток», в то время как сигналы немодифицированных днДНК в тех же условиях не наблюдались. Полученные результаты расширяют горизонты в области электрохимической и флуоресцентной детекции днДНК-ампликонов для решения различных задач.

Литература*:*
[1] M. Hocek, M. Fojta, Nucleobase modification as redox DNA labelling for electrochemical detection, Chem. Soc. Rev. 40 (2011) 5802.
[2] E.V. Suprun, G.R. Kutdusova, S.A. Khmeleva, S.P. Radko, Towards deeper understanding of DNA electrochemical oxidation on carbon electrodes, Electrochem. Commun. 124 (2021) 106947.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-14-00247, https://rscf.ru/project/19-14-00247/.

СОВМЕСТНОЕ ВНЕДРЕНИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ 1 И ИНГИБИТОРА АПФ ЭНАЛАПРИЛАТА В ГИБРИДНЫЕ ЧАСТИЦЫ

Тихомирова В.Е.,[а] Попова Е.В.,[а] Матвеева О.Д.,[а] Безнос О.В.,[б] Григорьев Ю.В.,[в] Чеснокова Н.Б.,[б] Кост О.А.[а]

[а] МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет
119991, Москва, Ленинские горы, 1с11, e-mail: vetikhomirova@gmail.com
[б] НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России
105062, Москва, Садовая-Черногрязская, 14/19
[в] ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН 119333, Москва, Ленинский пр-т., 59

Включение лекарственных средств в носители различной природы позволяет значительно повысить эффективность их действия. Например, включение ингибитора АПФ в покрытые 5 кДа хитозаном частицы из биосовместимого и биоразлагаемого фосфата кальция позволило не только увеличить время его жизни в слезной жидкости, но также добиться высокой эффективности снижения внутриглазного давления у кроликов [1].

В представленной работе мы одновременно включили в гибридные частицы, состоящие из неорганического фосфата кальция и 5 кДа хитозанового покрытия, две субстанции с различным механизмом снижения внутриглазного давления: низкомолекулярный ингибитор ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) эналаприлат и фермент супероксиддисмутазу 1 (СОД1).

Препараты с совместно включенными ингибитором АПФ и СОД1 готовили путем включения субстанций во время синтеза частиц. Полученные препараты были охарактеризованы методами динамического светорассеяния и сканирующей электронной микроскопии. Гибридные частицы с совместно включенными ингибитором АПФ и СОД1 имели средний гидродинамический диаметр 120–160 нм и ζ-потенциал +20±1 мВ. Процент включения эналаприлата и СОД1 в носители составил 56% и 30%, соответственно. Способность полученных препаратов снижать внутриглазное давление исследовали *in vivo* на нормотензивных кроликах породы Шиншилла. Местные инстилляции гибридных частиц с совместно включенными ингибитором АПФ и СОД1 позволили добиться более эффективного и продолжительного снижения внутриглазного давления по сравнению с эналаприлатом или ферментом в форме раствора. А также, помимо повышения эффективности снижения внутриглазного давления при инстилляции совместно включенных в гибридные частицы ингибитора АПФ и СОД1 по сравнению с отдельно включенными в носители препаратами, мы наблюдали синергический эффект, обусловленный различными физиологическими механизмами действия СОД1 и эналаприлата.

Литература
1. Popova E.V., Tikhomirova V.E., Beznos O.V., Chesnokova N.B., Grigoriev Y.V., Klyachko N.L., Kost O.A. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2022, **40**, 102493.

Работа выполнена при финансовой поддержке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (Регистрационная тема 121041500039-8), НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца (Регистрационная тема НИОКТР АААА-А21-121011190061-1), а также Министерства науки и высшего образования в рамках государственного задания ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

МЕХАНИЗМ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ У ГРАМ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Тихонова Т.В., Гаврилов С.Н., Осипов Е.М., Хренова М.Г., Дергоусова Н.И., Бонч-Осмоловская Е.А., Попов В.О.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук,
119071 Москва, Ленинский проспект 33, стр. 2
e-mail: ttikh2008@yandex.ru

Процессы анаэробного дыхания с участием нерастворимых внеклеточных акцепторов электронов, таких как минеральные формы оксидов металлов переменной валентности, широко распространены у бактерий. Эти процессы сопровождаются переносом электронов от клетки к пространственно отделенным от нее внеклеточным акцепторам и могут быть использованы для создания микробных биоэлектрохимических систем, для биоремедиации почв и очистки сточных вод, содержащих токсичные оксиды металлов.

Основной механизм экстраклеточного электронного транспорта (ЭЭТ) связан с участием комплексов мультигемовых цитохромов с, образующих линейные и разветвленные цепи переноса электронов, в которых терминальный цитохром цепи взаимодействует непосредственно с акцептором. Систематическое исследование ЭЭТ проводилось только для грам-отрицательных бактерий, для которых подробно исследованы структура и функции мультигемовых цитохромов с – компонентов ЭЭТ. Для грам-положительных микроорганизмов процессы ЭЭТ изучены слабо, несмотря на то, что грам-положительные железоредукторы доминируют в некоторых экологических нишах, в том числе среди термофилов – металлоредукторов. Проведенный нами протеомный и геномный анализ термофильного грам-положительного железоредуктора *Carboxydothermus ferrireducens* показал, что механизм ЭЭТ у этой бактерии отличается от тех, были ранее описаны для грам-отрицательных бактерий. В клетке были идентифицированы три новых мультигемовых цитохрома с OmhA, SmhA and SmhC, которые могут быть вовлечены в процесс трансформации ферригидрита в магнетит, осуществляемый *C. ferrireducens*. Один из них - конститутивный внеклеточный 11-гемовый цитохром OmhA – был выделен и охарактеризован. Показано, что OmhA способен переносить электроны на растворимые и нерастворимые соединения железа, такие как ферригидрит; субстраты мультигемовых оксидоредуктаз и растворимые низкомолекулярные переносчики электронов. Получена пространственная структура OmhA с разрешением 2.5 Å, из которой следует, что белок состоит из двух функционально разных доменов: электрон-транспортного домена, содержащего 11 гемов с, и домена связывания с S-слоем на поверхности клетки *C. ferrireducens*. Строение и укладка гемов с в электрон-транспортной цепи OmhA отличается от организации гемов в электрон-транспортных цитохромах из грам-отрицательных бактерий. Идентифицирован потенциальный сайт связывания OmhA с поверхностью ферригидрита. Предложен механизм переноса электронов на нерастворимый акцептор.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения 075-15-2021-1354 (07.10.2021).

ПРОВОДЯЩИЙ НАНОКОМПОЗИТ НА ОСНОВЕ ГЕЛЯ ХИТОЗАНА С МЕМБРАННЫМИ ФРАКЦИЯМИ БАКТЕРИЙ *GLUCONOBACTER OXYDANS* ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОАНОДА В БИОТОПЛИВНОМ ЭЛЕМЕНТЕ

Федина В.В., **Алферов С.В.**

НИЦ «БиоХимТех», Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии,
300012, Тула, Фридриха Энгельса 157,
e-mail: agapovaweronica@yandex.ru

Биотопливные элементы (БТЭ) представляют собой устройства, в которых биокатализаторы вырабатывают электроэнергию за счёт окисления органических веществ. Значительный прогресс в развитии токопроводящих полимерных композитов позволил перейти на новый уровень исследований процессов биоэлектрокатализа, что является особенно перспективным для альтернативных источников питания [1].

В качестве биокатализатора для работы были выбраны мембранные фракции (МФ) бактерий *Gluconobacter oxydans*. Данные системы включают PQQ-зависимые дегидрогеназы, которые способны окислять широкий спектр субстратов из-за наличия различных ферментов. Для функционирования БТЭ биокатализатор закрепляют на электроде при помощи полимерных гелей. Хитозан в композиции с углеродными нанотрубками (МУНТ) образует электроактивный гидрогель, благодаря которому МФ закрепляется на электроде и не вымывается с течением времени (рис. 1) [2].

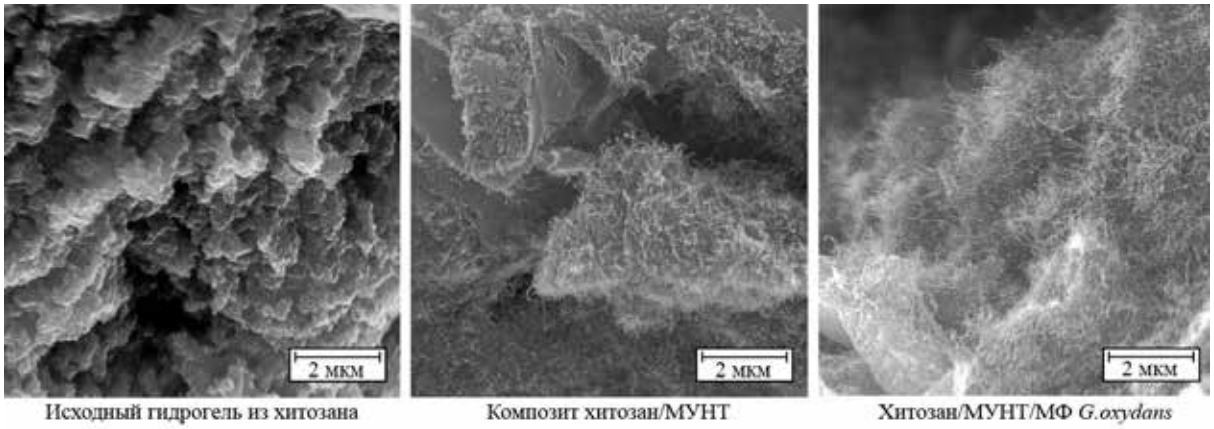


Рисунок 1. *Сканирующая электронная микроскопия гидрогелей хитозана*

Композит хитозана формирует однородный гель с равномерным распределением МУНТ, что позволяет говорить об эффективном контакте между медиатором, электропроводящей матрицей и МФ. Установлено, что производительность БТЭ повышалась, по сравнению с предыдущими исследованиями. Удельная мощность макета БТЭ составляла $1{,}39*10^{-5}$ Вт/мм^2, а максимальная мощность – $(49\pm4)*10^{-4}$ Вт при внешнем сопротивлении 10 кОм.

Литература

Tang J. et al. Development of graphene-based enzymatic biofuel cells: A minireview // Bioelectrochemistry. – 2020. – Т. 134. – С. 107537.

Arlyapov V. A. et al. Microbial Biosensors for Rapid Determination of Biochemical Oxygen Demand: Approaches, Tendencies and Development Prospects // Biosensors. – 2022. – Т. 12. – №. 10. – С. 842.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания в области научной деятельности проект № FEWG-2021-0013.

3D И 2D СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АНСАМБЛИ ЛИЗОЦИМА И АНИОННЫХ ПОЛИМЕРОВ

Филатова Л.Ю., Балабушевич Н.Г., Чубарь Т.А., Клячко Н.Л.

Химический факультет МГУ, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы 1–11, e–mail: luboff.filatova@gmail.com

Полиионные комплексы лизоцима белка куриного яйца с анионными полимерами ($mPEG_{5k}$–b–PLE_x, муцин из желудка свиньи, альгинаты) являются перспективными кандидатами в качестве агентов противомикробной терапии. Лизоцим гидролизует β–1,4 гликозидные связи между N–ацетилмурамовой кислотой и N–ацетил–D–глюкозоамином в пептидогликане клеточных стенок патогенных микроорганизмов. Лизоцим проявляет высокую эффективность при деструкции клеток грам–положительных бактерий (*Staphylococcus aureus, Bacillus stearothermophilus, Clostridium tyrobutyricum*). Понимание особенностей структуры и функционирования комплексов лизоцима с полианионами как в объеме жидкости, так и на границе раздела жидкость–воздух является важной фундаментальной и прикладной задачей. В качестве простейших моделей жидкой фазы и границы раздела можно рассмотреть водную фазу и границу вода–воздух.

Цель работы – установить влияние природы полианиона на физико–химические параметры его взаимодействия с лизоцимом в водной фазе и на границе вода–воздух. При проведении исследований был использован широкий спектр физико–химических методов: турбидиметрия, тензиометрия, получение тонких монослойных пленок, реология, флуоресценция, КД–спектроскопия, электрофоретическое светорассеяние, анализ траекторий движения частиц, просвечивающая и сканирующая электронная микроскопия, хроматография, электрофорез, микробиология.

Для всех полианионов ($mPEG_{5k}$–b–PLE_{10}, $mPEG_{5k}$–b–PLE_{50}, $mPEG_{5k}$–b–PLE_{100}, муцин из желудка свиньи, альгинаты низкой и высокой вязкости) показано образование супрамолекулярных ансамблей с лизоцимом в объеме раствора. Они образуются преимущественно за счет электростатических взаимодействий, но также установлено наличие ван дер ваальсовых взаимодействий и водородного связывания. Ассоциаты лизоцима с альгинатами или блок–сополимерами $mPEG_{5k}$–b–PLE_x представляют собой сферические микро или наночастицы с отрицательным дзета–потенциалом. При взаимодействии лизоцима с муцином образуются микроструктуры неправильной формы. При взаимодействии лизоцима с полианионами происходит изменение его третичной структуры и антибактериальной активности. Изменение активности фермента происходит предположительно за счет того, что в формировании электростатических контактов участвует остаток лизина, находящийся близко к активному центру фермента.

При взаимодействии лизоцима с $mPEG_{5k}$–b–PLE_{50} на границе вода–воздух образуются структуры, содержащие блок–сополимер и фермент. Фермент и блок–сополимер образуют тонкие пленки на границе раздела фаз, входящий в их состав фермент проявляет антимикробную активность.

Полученные данные могут быть использованы в биотехнологии и фармацевтике для получения самоорганизующихся материалов с антимикробными свойствами.

Работа выполнена в рамках государственного задания тема № 121041500039–8.

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ СИСТЕМА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ФОСФОЛИПАЗЫ А2 И ХИМОЗИНА МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *P.PASTORIS*

Филькин С.Ю., Чертова Н.В., Князева К.Э., Цедилин А.М., Липкин А.В., Федоров А.Н.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской Академии Наук,
119071, Москва, Ленинский проспект 33,
e-mail: s.filkin@fbras.ru

Разработана система по созданию штаммов-продуцентов рекомбинантных ферментов для нужд промышленности. Подобраны условия для высокоэффективной экспрессии рекомбинантных ферментов в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*. Получен набор штаммов *Pichia pastoris*, продуцирующих более 250 мг/л фосфолипазы A_2 *Streptomyces violaceoruber* и 400 мг/л прохимозина *Bos taurus*[1]. При создании экспрессионных кассет были протестированы различные промоторы, включая pAOX1, pGAP, pG1, а также различные варианты секреторных последовательностей. Отработаны протоколы выделения, очистки и концентрирования рекомбинантных фосфолипазы A_2 и химозина, удовлетворяющие требованиям промышленного производства[2]. Охарактеризованы физико-химические свойства выделенных функционально-активных ферментов.

Помимо использования традиционных молоко-свертывающих ферментов (химозина быка и верблюда), идет активный поиск альтернативных молоко-свертывающих ферментов. Химозин *Delphinapterus leucas* обладает уникальными физико-химическими свойствами, так как способен эффективно сворачивать молоко белухи, обладающее высокой жирностью. В *Pichia pastoris* нами был получен штамм-продуцент рекомбинантного химозина белухи с продуктивностью 50 мг/л. Однако, удельная активность этого фермента на коровьем молоке оказалась недостаточной для промышленного использования.

Коэкспрессия транскрипционных факторов является одним из подходов к увеличению продукции рекомбинантных ферментов при экспрессии в *Pichia pastoris*. Один из таких факторов, HAC1 – основной регулятор клеточного ответа на неправильное сворачивание белков. Коэкспрессия sHAC1 существенно повысила выход рекомбинантного химозина быка. Проведен сравнительный анализ метаболомов штамма дикого типа и штаммов-продуцентов химозина при коэкспрессии sHAC1, выявлены механизмы, лежащие в основе увеличения продуктивности секреторных белков при коэкспрессии sHAC1.

Литература
1. *Филькин С.Ю., Чертова Н.В., Зацепин С.С., Садыхов Э.Г., Фёдоров А.Н., Липкин А.В.* Прикладная биохимия и микробиология, 2021, **57**, № 3, 228.
2. *Филькин С.Ю., Чертова Н.В., Вавилова Е.А., Зацепин С.С., Эльдаров М.А., Садыхов Э.Г., Фёдоров А.Н., Липкин А.В.* Прикладная биохимия и микробиология, 2020. **56**, 571.
3. Filkin S.Y., Lipkin A.V., Fedorov A.N. *Biochemistry (Mosc.),* 2020, **85,** 177.
4. Filkin S.Y., Chertova N.V., Zenin V.A., Lipkin A.V., Sadykhov E.G., Popov V.O., Fedorov A.N., Sichev A.A., Bityak D.S. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2020, **50**, 549.
5. *Филькин С.Ю., Чертова Н.В., Эльдаров М.А., Липкин А.В., Федоров А.Н., Садыхов Э.Г.* Патент 2769175, 2022.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы по развитию генетических технологий на 2019-2027 годы (Соглашение № 075-15-2021-1071)

ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ: СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ В МИКРОАНАЛИЗЕ

Франк Л.А., Красицкая В.В., Башмакова Е.Е., Кудрявцев А.Н., Панамарев Н.С.

Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН.
660036, Красноярск, Академгородок 50/50,
e-mail: frankla@ibp.ru

Функционирование биолюминесцентных систем большинства известных морских организмов основано на окислении одного и того же субстрата – целентеразина (CTZ), катализируемого ферментами люциферазами. Несмотря на широкое разнообразие структур и механизмов реакции, эти ферменты объединяют в одну группу под названием CTZ-зависимые люциферазы. Различают два их типа, резко отличающихся по организации – собственно люциферазы, которые функционируют в соответствии с классической фермент-субстратной кинетикой и Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины, представляющие собой стабильный фермент-субстратный комплекс из апофотопротеина и предокисленного производного субстрата – 2-пероксицелентеразина, который при связывании ионов Ca^{2+} распадается с образованием конечных продуктов – CO_2, комплекса белок-целентерамид-$3Ca^{2+}$ и кванта света. Практически все CTZ-зависимые люциферазы являются одноцепочечными белками с относительно низкой молекулярной массой – от 16,5 до 36 кДа. Их биолюминесценция наблюдается в близком диапазоне спектра с максимумами при 460–480 нм, поскольку во всех случаях излучение происходит благодаря переходу из возбужденного состояния в основное одного и того же соединения – молекулы целентерамида (или его близких аналогов). Высокий квантовый выход, малый размер, стабильность в широком диапазоне условий легли в основу практического интереса к этим ферментам как перспективным аналитическим инструментам.

Гены многих CTZ-зависимых люцифераз клонированы и созданы бактериальные штаммы-продуценты их рекомбинантных аналогов, что сделало белки доступными для фундаментальных исследований и приложений. Получены варианты люцифераз и фотопротеинов с новыми полезными свойствами, а также специфичные биолюминесцентные сенсоры с помощью химического коньюгирования либо генетического фьюзинга с рядом биоспецифичных молекул – иммуноглобулинами, онкомаркерами, гаптенами, олигонуклеотидами, в том числе ДНК(РНК)-аптамерами. Разработан иммуноанализ сэндвич- и конкурентного типов для выявления гормонов, онкомаркеров, инфекционных агентов; предложен способ быстрого выявления однонуклеотидных полиморфизмов, связанных с предрасположенностью к определенным заболеваниям; на основе аптамерной сенсорики предложен способ выявления патогенных аутоантител к основному белку миелина для диагностики рассеянного склероза; способ выявления онкомаркеров в сыворотке пациентов для ранней диагностики рака легкого; показана принципиальная возможность определения гликированной формы гемоглобина для диагностики и мониторинга сахарного диабета. Разрабатываются способы однофазного биолюминесценного анализа на основе явления комплементации фрагментов люциферазы с восстановлением биолюминесцентной активности.

Показано, что биолюминесцентные репортеры на основе CTZ-зависимых люцифераз обеспечивают чувствительность анализа, сравнимую с таковой радиоизотопного метода, они безопасны, позволяют проводить анализ в короткое время и не требуют высокой квалификации персонала.

Исследование частично выполнено при финансовой поддержке Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности, КЗ 2023031309571.

РАЗРАБОТКА ИНСТРУМЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СУБКЛЕТОЧНОЙ ДИНАМИКИ ГИПОГАЛОГЕННОГО СТРЕССА

Чебаненко В.В., Костюк А.И., Храмова Ю.В., Билан Д.С.

Институт биоорганической химии им. Шемякина и Овчинникова РАН, отдел метаболизма и редокс-биологии, группа метаболических основ патологии; ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997; vvchebanenko@yandex.ru

Гипогалогенные кислоты, продуцируемые клетками врожденного иммунитета, являются сильными окислителями, высокоэффективными в борьбе с патогенами. Однако их чрезмерная выработка, например, при хроническом воспалении, приводит к развитию гипогалогенного стресса, ассоциированного с различными заболеваниями.

Известно, что субклеточные эффекты стресса обусловлены избирательным воздействием окислителей на определенные компартменты. Однако, ввиду отсутствия эффективных аналитических инструментов, точные механизмы остаются неизвестными. Для их выяснения необходимо разработать подходы, позволяющие визуализировать динамику процесса в реальном времени. Генетически кодируемый флуоресцентный сенсор (псевдо)гипогалогенных кислот Hypocrates потенциально способен решить описанную задачу [1]. Целью этой работы является оптимизация данного индикатора и создание палитры конструкций для его субклеточной экспрессии.

С помощью случайного мутагенеза найдена оптимизированная версия сенсора, обладающая увеличенной амплитудой ответа на аналиты. В ходе направленного перебора аминокислотных остатков, расположенных в непосредственной близости к хромофору, получен мутант Asp109Cys, обладающий сниженной чувствительностью к pH в широком диапазоне. Кроме того, на основе исходного сенсора и его контроля были разработаны версии, для визуализации гипогалогенного стресса в субклеточных компартментах (плазмалемма, цитозоль, ядро, люмен ЭПР и матрикс митохондрий). Корректная экспрессия сенсора в компартментах подтверждена путем колокализации его сигнала с окрашиванием специфичными агентами.

Выводы:

Биосенсор Hypocrates оптимизирован по таким параметрам, как амплитуда ответа (улучшена в 2 раза) и чувствительность к pH в широком диапазоне (снижена в 15 раз). Созданы версии сенсора с направленной экспрессией на мембране, в цитозоле, ядре, ЭПР и митохондриях.

Литература:

Kostyuk, A.I., Tossounian, MA., Panova, A.S. et al. Hypocrates is a genetically encoded fluorescent biosensor for (pseudo) hypohalous acids and their derivatives. Nat Commun **13**, 171 (2022).

РЕКОМБИНАНТНАЯ BST-ПОЛИМЕРАЗА ДЛЯ «БЫСТРЫХ» ТЕСТОВ НА ОСНОВЕ МЕТОДА LAMP

Черкашина А.С., Пика М.И., Михеева О.О., Красовитов К., Петров В.В., Акимкин В.Г.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора,
111123, Россия, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а,
cherkashina@pcr.ms

Методы изотермической амплификации завоевывают все большую популярность для диагностики различных инфекционных заболеваний. В условиях беспрецедентно больших объемов тестирования населения во время пандемии COVID-19 методы «быстрой» идентификации возбудителя показали свою востребованность и эффективность. Одним из таких методов является петлевая изотермическая амплификация (Loop-Mediated Isothermal Amplification — LAMP). Метод обладает более высокой специфичностью по сравнению с ПЦР, практически не уступает по чувствительности и является более быстрым, простым и экономичным. В основе метода лежит использование нескольких пар диагностических праймеров и особый фермент – полимераза с вытесняющей активностью – Bst-полимераза из бактерий *Geobacillus stearothermophilus*.

Целью данной работы была разработка структуры синтетического гена Bst-полимеразы, протоколов выделения и очистки фермента и характеристика его свойств в условиях реакций петлевой изотермической амплификации (LAMP).

Bst-полимераза представляет собой большой фрагмент (БФ) ДНК-зависимой ДНК полимеразы I из бактерий *Geobacillus stearothermophilus*. Уникальные свойства фермента, такие как высокая процессивность, наличие вытесняющей активности и температурный оптимум работы при 60-65°C позволили разработать метод петлевой изотермической амплификации на основе данного фермента.

В работе разработана оригинальная нуклеотидная последовательность и генно-инженерная конструкция для экспрессии рекомбинантной Bst-полимеразы в клетках *E.coli*, разработан эффективный протокол выделения и очистки фермента. Показано, что изменения нуклеотидной последовательности (оптимизация кодонов) приводят к повышенному уровню экспрессии белка и более высокой активности фермента, что позволяет стабилизировать выход фермента (до 20% от клеточной масы) и повышает его эффективность.

Проведена характеристика свойств полученной рекомбинантной полимеразы Bst-NHm4 в реакции петлевой изотермической амплификации (LAMP). Сравнение каталитических свойств полученного фермента с коммерческим ферментом Bst 2.0 ДНК-полимераза (NEB, США) в реакции LAMP показывает идентичные результаты, в том числе при низких концентрациях детектируемой матрицы.

Полученные результаты позволили получить фермент, сопоставимый по своим каталитическим характеристикам с коммерческим ферментом Bst 2.0 ДНК-полимераза (NEB, США) и обеспечивают базис для разработки модифицированных ферментов с улучшенными свойствами.

СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА БИФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПЛАТФОРМЫ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА-ЗОЛОТА ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Чудосай Ю.В., [1] **Сорокина М.А.,**[2] **Абакумов М.А.,** [3] **Клячко Н.Л.,** [4]

Лаборатория биомедицинские наноматериалы МГУ им. М.В. Ломоносова
[1] *chudosay@gmail.com,* [2] *sorokina.marina.a98@gamil.com,* [3] *abakumov1988@gmail.com,* [4] *nlklyachko@gmail.com*

Одним из наиболее интересных объектов с точки зрения применения в биомедицине являются гибридные структуры на основе магнитных наночастиц (НЧ) и НЧ благородных металлов, позволяющие одновременно вводить на поверхность НЧ два типа лигандов для их дальнейшего использования. использование для фотодинамической терапии рака (ФДТ) (комбинация фотосенсибилизатора (ФС) для терапии и флуорофора (ФП) для обнаружения платформы). Целью данной работы был синтез и исследование НЧ Fe3O4-Au с «гантелевидной» структурой в качестве бифункциональной платформы для терапии онкологических заболеваний. В результате разложения пентакарбонила железа в дифениловых эфирах в присутствии тетрахлоруратов водорода синтезированы гибридные НЧ магнетита и золота с размером Fe3O4 10,8 ± 1,5 нм и Au 4,4 ± 0,8 нм (по данным ПЭМ), стабилизированные олеиновой кислотой. По результатам рентгенофазового анализа синтезированные НЧ имеют кристаллическую структуру типа «шпинель» с периодом решетки 0,8387 нм. По результатам измерения магнитных свойств НЧ имели намагниченность насыщения 62 Ам2·кг (Fe3O4)-1 и коэрцитивную силу 13 Э. НЧ модифицировали 3,4-дигидроксифенилуксусной кислотой (ДОФУК) для последующего покрытия стабилизирующим полиэтиленгликолем (ПЭГ) карбодиимидным методом. Поскольку в одной системе необходимо объединить два разных вещества (ПС и ФП), в качестве «звена» были использованы НЧ Fe3O4-Au (стабилизированные). При исследовании оптических свойств синтезированной платформы Fe3O4-Au/ПС/ФП пики излучения и поглощения ПС и ФП были идентичны пикам ПС и ФП в растворе. Также анализы ЯМР и ИК подтвердили структуру системы. В дальнейшем планируется рассчитать физико-химические параметры синтезированной системы для оптимизации и терапии *in vitro* и *in vivo*.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ДНК/РНК-СЕНСОРЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОК-НАНОЗИМОВ «ИСКУССТВЕННАЯ ПЕРОКСИДАЗА»

Шавокшина В.А.[а], **Комкова М.А.**[а], **Зарочинцев А.А.**[а], **Андреев Е.А.**[а], **Мельник Д.М.**[б], **Апарин И.О.**[в], **Зацепин Т.С.**[б], **Карякин А.А.**[а]

[а] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы 1/3,*
e-mail: shavokshinava@my.msu.ru
[б] *Сколковский институт науки и технологий, 121205, Москва, Большой бульвар 30 стр.1*
[в] *Университет Страсбурга, 67401, Илькирш, route du Rhin 74*

Электрохимические сенсоры для определения олигонуклеотидов представляют интерес благодаря низкой стоимости и высокой чувствительности, а возможность генерации электрического сигнала упрощает интеграцию сенсора в компактные электронные устройства. С целью повышения чувствительности и селективности анализа для регистрации гибридизации в ДНК-сенсорах используют метки. В качестве меток нередко используется природный фермент – пероксидаза хрена. Известно, что каталитически синтезированные наночастицы берлинской лазури (НЧ БЛ) обладают сверхвысокой активностью в реакции восстановлении H_2O_2, не проявляя оксидазной активности [1]. В связи с этим возникает интерес к разработке электрохимических ДНК-сенсоров на основе нанозимов, имитирующих работу пероксидазы, в качестве электрокаталитических меток.

В данной работе в качестве электрокаталитических меток были использованы каталитически синтезированные композитные наночастицы – НЧ БЛ/поли(3,4-(1-азидометилэтилен)диокситиофен (ПЭДОТ-N_3). Азидные группы полимера позволяют проводить конъюгацию меток с алкин-модифицированными олигонуклеотидами в одну стадию в результате «клик»-реакции. Для создания электрохимического сенсора ДНК-зонды (70 нуклеотидов) иммобилизовали клик-реакцией на поверхности электрода, модифицированного ПЭДОТ-N_3. Этот проводящий полимер способствует повышению электрохимической активности анионных медиаторов на поверхности электродов, а также снижает неспецифическую адсорбцию [2]. Комплементарная ДНК-мишень (25 нуклеотидов) содержала композитные НЧ БЛ в качестве электрокаталитической метки. Гибридизацию регистрировали в режиме хроноамперометрии в присутствии H_2O_2. Разработанный сенсор позволяет определять целевые ДНК в широком диапазоне концентраций: от 0,01 до 3 нМ. При введении в систему подвижного медиатора ток восстановления H_2O_2 увеличивается всего в 3-8 раз, что подтверждает высокую эффективность электрокаталитических меток. Кроме того, показана возможность применения сенсора для количественного определения целевых ДНК при конкурентном анализе в сыворотке крови человека [3].

Для детектирования участка РНК HULC (Highly Up-regulated in Liver Cancer), которая является маркером гепатоцеллюлярной карциномы, выполнен анализ сэндвич-типа. При этом участок целевой РНК гибридизовался с комплементарным ДНК-зондом и ДНК-мишенью, связанной с НЧ БЛ. Разработанный ДНК/РНК-сенсор позволяет детектировать целевые РНК в диапазоне от 0,2 до 100 нМ, а также способен функционировать в сыворотке крови человека.

Литература
1. Komkova M.A., Karyakina E.E., Karyakin A.A. *J. Am. Chem. Soc*., 2018, **140**, 11302.
2. Shavokshina V.A., Komkova M.A., Aparin I.O., Zatsepin T.S., Karyakin A.A., Andreev E.A., *ACS Appl. Polym. Mater*., **3**, 2021, 1518.
3. Komkova M.A., Shavokshina V.A., Zarochintsev A.A., Melnik D.M., Aparin I.O., Zatsepin T.S., Karyakin A.A. *Talanta, 2023,* **257, 124337.**

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 19-13-00131.

НОВЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ НАНОРЕАКТОРЫ, ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ *IN VIVO*

Шайхутдинова З.М.[а,б], Паширова Т.Н.[а,б], Мансурова М.Н.[а], Казакова Р.Р.[а], Богданов А.В.[б], Татаринов Д.А.[б], Массон П.[а]

[а] Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, 420008, Казань, Кремлевская,18
[б] Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, 420029, Казань, ул. Академика Арбузова, 8
e-mail: shajhutdinova.z@mail.ru

Нанобиотехнология ферментных нанореакторов (nR) – это новая, активно развивающаяся область исследований. Такие системы способны осуществлять одиночные и/или каскадные реакции, биосинтез, деградацию токсичных молекул [1]. Инкапсулирование ферментов в наноносители предназначено, в первую очередь, для преодоления быстрого клиренса и иммунного ответа после инъекции гетерологичных терапевтических ферментов. Во-вторых, инкапсулирование ферментов обеспечивает высокую концентрацию каталитического фермента и стабильность наноконтейнерах [2]. В условиях инъекционного нанореактора токсикант, присутствующий в кровотоке, диффундирует через мембрану нанореактора, где далее в его герметичном отсеке проходит ферментативная реакция детоксикации.

Целью работы является дизайн и разработка инъекционных ферментсодержащих nR для *in vivo* детоксикации фосфорорганического соединения параоксон (POX). В качестве фермента использовались мутанты фосфотриэстеразы термофильных архей *Sulfolobus solfataricus* (PTE), проявляющие высокую эффективность в отношении POX с k_{cat}/K_m $1.1x10^5$ $M^{-1}c^{-1}$ при 25°C [3]. В качестве nR были выбраны полимерсомы, полученные в результате самосборки амфифильных блок-сополимеров полиэтиленгликоль и полипропиленсульфид с Мв = 750 и 2000 и концентрацией от 0.1 до 3% (масс.). nR охарактеризованы методами динамического рассеяния света и просвечивающей электронной микроскопии. Размер nR составляет 100 нм с PDI не превышающим 0.2, дзета-потенциал варьируется от -5±1 до -25±1 мВ. *In vitro* моделирование реакции нейтрализации POX показало, что nR-750 и nR-2000 с PTE (1 мкМ) инактивировали POX (5 мкМ) менее чем за 10 с. Оценка эффективности нанореакторов *in vivo,* а именно $ЛД_{50}$ сдвиги, у интактных и леченых ферментными нанореакторами (профилактическое и постэкспозиционное внутривенное введение) мышей CD-1, зараженных POX (подкожно), составили $16.6×ЛД_{50}$ (профилактика) и $9.8×ЛД_{50}$ (лечение) для nR-750, содержащих 1.6 нМ PTE, и $23.5×ЛД_{50}$ и $7.9×ЛД_{50}$ для nR-2000, содержащих 0.37 нМ PTE [4].

Таким образом, терапевтические нанореакторы на основе блок-сополимеров, содержащие PTE, эффективны как *in vitro*, так и *in vivo* для детоксикации POX.

Литература
1. Pashirova T.N., Bogdanov A.V., Masson P. *Chem.-Biolog. Interact*, 2021, **346**, 109577
2. Shajhutdinova Z.M., Pashirova T.N., Masson P. *Biomedicines*, 2022, **10**, 784.
3. Poirier L., Jacquet P., Plener L., Masson P., et al. *Environ. Sci. Pollut. Res.,* 2021, **28**, 25081-25106.
4. Pashirova T.N., Masson P., et al. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 2022, **14**, 19241 - 19252.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ, проект № 20-14-00155-П.

БИОМОДИФИКАЦИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ ДРЕВЕСНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГРИБА *P. VERRUCULOSUM*

ШевченкоА.Р.[а], Тышкунова И.В.[б], Майорова К.А.[а], Чухчин Д.Г.[а], Аксенов А.С.[а]

[а] Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, г. Архангельск, наб. Серверной Двины 17, e-mail: a.shevchenko@narfu.ru

[б] Институт высокомолекулярных соединений РАН, В. О. Большой пр. 3, г. Санкт-Петербург

В настоящее время сульфатный метод делигнификации не только экономичен и эффективен с точки зрения производства древесных полуфабрикатов, но и перспективен для повышения реакционной способности целлюлозы к ферментативной конверсии. Высокие показатели в направлении биодеструкции показали ферментные препараты на основе штаммов *P. verruculosum* [1]. В процессе биокатализа комплексами карбогидраз образуются сахара, и одновременно происходит модификация структуры растительных волокон, с приобретением ценных характеристик для создания новых материалов [2]. Таким образом, полученная биомодифицированная сульфатная целлюлоза (БСЦ) соответствует концепции безотходности биоэкономики. Необходимы дополнительные исследования глубокого ферментативного гидролиза сульфатной целлюлозы для оценки свойств, состава и структуры БСЦ и возможности использования целлюлозной матрицы в нанотехнологиях, фармацевтике, энергетике и других областях промышленности.

В экспериментах использовали образцы беленой сульфатной целлюлозы лиственных пород (72% целлюлозы, 22% ксилана) и лабораторные ферментные препараты, продуцируемые рекомбинантными штаммами *P. verruculosum*. Конверсию проводили в биореакторе Biostat A Plus с концентрацией субстрата 10%, расходе ферментов 10 АФБ/г а.с.с., 50 °С, pH 5.0, в течение 72 ч. Анализировали кристалличность и степень полимеризации [2]. Для получения криогелей использовали 85% H_3PO_4 при концентрации БСЦ 5% в течение 24 ч., высаждением водой, заморозкой и лиофильной сушкой.

В процессе биокатализа под действием комплекса карбогидраз происходит как накопление растворимых продуктов – глюкозы (6%), ксилозы (1%), ксилобиозы (0,7%) и др. сахаров, так и изменение состава БСЦ, а степень конверсии полуфабриката достигает 73%. Максимальное содержание целлюлозы в остатке обнаружено при 24 ч. конверсии (82,7%). Степень полимеризации за 72 ч. снизилась в 4 раза до 235 ед., а полученные БСЦ на начальных этапах конверсии обладали повышенной кристалличностью (рис.1). Криогели из БСЦ характеризовались средним значением выхода - 67,8%, пористостью 96% и плотностью 0.049-0,115 г/см^3. Образец криогеля из БСЦ после 24 часов биоконверсии, со значениями механической прочности (2835±295 кПа) и удельной поверхности (7,94 м^2/г), обладал наиболее близкими характеристиками ранее полученным криогелям из МКЦ [2].

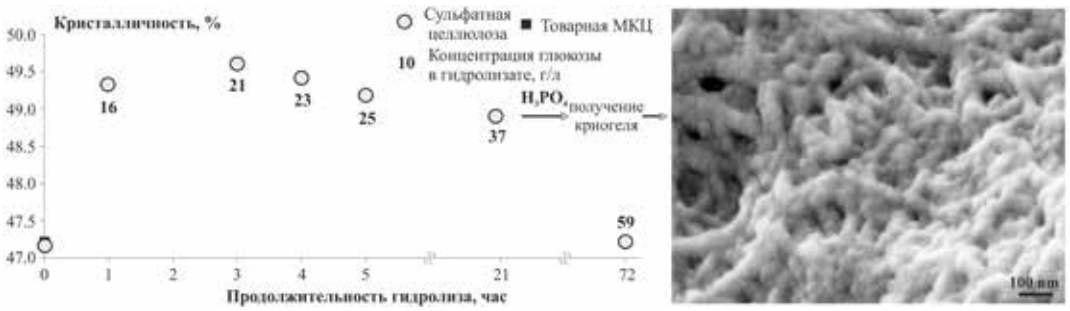


Рисунок 1. *Изменение кристалличности БСЦ и SEM-изображение криогеля после 24 часов биоконверсии*

Литература
1. Sinitsyn A. P.. et al. Applied Biochemistry and Microbiology. – 2021. – Т. 57. – С. 851-865.
2. Shevchenko A. R. et al. Catalysts. – 2023. – Т. 13. – №. 1. – С. 103.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 22-24-20136.

УСТРОЙСТВО АКТИВНОГО ЦЕНТРА ТРАНСАМИНАЗЫ DАМИНОКИСЛОТ ИЗ *AMINOBACTERIUM COLOMBIENSE*

Шилова С.А.[1], Бойко К.М.[1], Николаева А.Ю.[3], Матюта И.О.[1], Хренова М.Г.[1,2], Попов В.О.[1,2], Безсуднова Е.Ю.[1]

[1] Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33, с.2
zavyalovasonya@yandex.ru
[2] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва
[3] Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

Функциональные димеры трансаминаз структурно консервативны, при этом разнообразие субстратной специфичности достигается сочетанием различных по свойствам аминокислотных остатков в геометрически сходных активных центрах. Пиридоксаль5'-фосфат (PLP)-зависимая трансаминаза D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense (*AmicoTA) катализирует реакцию стереоселективного переаминирования между D-аминокислотами и αкетокислотами при pH 8-9 и 30-60 °C [1]. Активный центр AmicoTA включает мотивы последовательностей, характерные как для канонических трансаминаз D-аминокислот (например, трансаминазы из *Bacillus sp.* YM-1 [2]), так и для неканонической трансаминазы с широкой субстратной специфичностью из *Curtobacterium pusillum [3].*

Мы охарактеризовали устройство активного центра AmicoTA кинетическими и термодинамическими методами, методами кристаллографии, точечного мутагенеза и молекулярной динамики. В результате остатки активного центра были поделены на только связывающие субстрат и вовлеченные как в катализ, так и в стабилизацию фермента. Специфичность AmicoTA к D-аминокислотам/α-кетокислотам достигается связыванием α-карбоксильной группы субстратов «карбоксилатной ловушкой», образованной триадой аминокислот – R27, T34 и H175 [1]. Остатки канонической «карбоксилатной ловушки» на O-петле не участвуют ни в связывании, ни в стабилизации AmicoTA, хотя именно остатки гибкой O-петли определяют спектр субстратов у трансаминаз IV типа PLP-укладки. Высокая специфичность фермента к D-глутамату/α-кетоглутарату обусловлена взаимодействием γ-карбоксильной группы с остатком K237 [1], тогда как эффективность связывания других D-аминокислот определяется их координацией в активном центре, настроенном для D-глутамата/α-кетоглутарата. Остатки R88 и E113 не вовлечены в связывание субстратов, но определяют геометрию активного центра фермента и стабильность функционального димера. Остатки β-поворота 1 участвуют в связывании субстратов, в катализе и в стабилизации функционального димера. Таким образом, функция остатков активного центра AmicoTA и гомологичных ей неканонических трансаминаз не ограничивается связыванием субстратов, а включает поддержание рабочей конформации фермента и стабилизацию функционального димера.

Литература
1. Shilova S.A. et al. *Molecules.* **2023**, 28, 2109.
2. Peisach D. et al. *Biochemitsry.* **1998**, 37, 4958.
3. Pavkov-Keller T. et al. *Scientific Reports.* **2016**, 6, 38183.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-14-00164.

ОПТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ИМИДЖИНГ ОПУХОЛЕЙ ПРИ АПОПТОЗЕ И ОТВЕТЕ НА ХИМИОТЕРАПИЮ

Ширманова М.В.,[а] Гаврина А. И.,[а] Щеславский В.И.,[а] Ковалева Т.Ф., [а] Дружкова И.Н.,[а] Игнатова Н.И., [а] Лукьянов К.А.,[б] Загайнова Е.В.[а]

[а] Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, 603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/,
e-mail: Shirmanovam@gmail.com
[б] Сколковский институт науки и технологий,
121205, Москва, Большой бульвар (Сколково), 30, стр.1

Метод флуоресцентной время-разрешенной микроскопии (FLIM) с использованием генетически-кодируемых сенсоров и собственной флуоресценции клеток позволяет наблюдать в динамике разнообразные клеточные процессы *in vitro* и *in vivo*. В частности, путем оценки интенсивности и времени жизни флуоресценции метаболических кофакторов восстановленного НАД(Ф)Н и окисленного ФАД возможна оценка редокс-статуса опухолевых клеток. Комбинированное использование метаболического FLIM с генетически-кодируемыми флуоресцентными белками-сенсорами предоставляет более полную информацию об этих процессах. Высокий интерес вызывают исследования метаболизма опухолевых клеток при противоопухолевой терапии и индукции апоптотической гибели, поскольку устойчивость к апоптозу является одним из механизмов низкой эффективности лечения.

В своих исследованиях мы провели анализ метаболических изменений в культивируемых опухолевых клетках и опухолях животных in vivo при действии стауроспорина в качестве индуктора апоптоза и различных химиотерапевтических агентов. Для идентификации апотоза был использован новый генетически-кодируемый сенсор активности каспазы-3 mKate2-DEVD-iRFP[1]. Было выявлено, что метаболические изменения, регистрируемые с помощью FLIM, имеют схожий характер для препаратов с различным механизмом действия[2]. Обнаружено увеличение фракции связанного с белком НАД(Ф)Н и увеличение редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н, что указывает на сдвиг метаболического баланса в сторону окислительного фосфорилирования. Интересно, что в случае химиотерапевтических воздействий данные изменения развивались независимо от характера ответа на клеточном уровне (апоптоз или остановка пролиферации)[3]. При этом повышение вклада связанной формы НАД(Ф)Н и активация каспазы-3 хорошо коррелировали в накоплением активных форм кислорода (АФК) в клетках. Интересно, что при воздействии стауроспорином была зарегистрирована фосфорилированная форма НАДФН, имеющая характерное время жизни флуоресценции, что вероятно связано с высоким уровнем АФК[4].

Разработанные методики перспективны для исследования механизмов действия терапевтических агентов и мониторинга функционального состояния опухолевых клеток опухоли при лечении.

Литература
Zlobovskaya, O. A. et al. Biotechniques, 60, 62, 2016.
Lukina M. M. et al. Cytometry Part A, 95A: 47–55, 2019.
3. Sergeeva, T. F. et al. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Res. 1864, 604–611. 2017.
4. Shirmanova M.V. et al., Scientific Reports, 12:4476, 2022.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 20-14-00111-П.

СИСТЕМА РЕГУЛЦИИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ - ОСНОВА МОНИТОРИНГА ПОСЛЕДСТВИЙ ВQВОЗДЕЙСТВИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ НА БИОЛОГИЧЕКСИЕ ОБЪЕКТЫ

Шишкина Л.Н., Дубовик А.С., Козлов М.В., Швыдкий В.О.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук,
119334, Москва, ул. Косыгина 4,
e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Важность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в регуляции метаболизма в биологических системах в настоящее время общепризнана. В норме стационарность процессов ПОЛ в биологических объектах поддерживается физико-химической системой регуляции, среди параметров которой интенсивность процессов ПОЛ, состав и физико-химические свойства липидов, структурной состояние мембран [1, 2]. Возможность использования параметров этой системы регуляции для оценки последствий воздействия неблагоприятных экологических факторов обусловлена их высокой чувствительностью к действию радиации и химических токсикантов в малых дозах на организм [2, 3]. Однотипность функционирования системы регуляции ПОЛ на разных уровнях организации биообъектов [4] позволяет использовать биологические модели для оценки воздействия различных неблагоприятных факторов на организм.

Мицеллы, образующиеся при спонтанной агрегации соевого лецитина в водной среде, являются адекватной модельной системой биологических мембран. Высокая лабильность липидного компонента природных объектов обусловливает существенные различия количественного соотношения фракций фосфолипидов и физико-химических свойств липидов лецитина из разных партий [5], что позволяет оценить воздействие неблагоприятных экологических факторов разной природы на биологические объекты в зависимости от исходного состояния в них процессов ПОЛ.

Для анализа последствий воздействия различных факторов (ионы металлов переменной валентности, тиофосфат натрия, Твин-80, ацетон, техногенные токсиканты) на биологические объекты были использованы следующие методы: определение интенсивности ПОЛ в органах мышей и при спонтанном окислении лецитина; анализ состава липидов (методы ТСХ и спектрометрия); выявление комплексообразования компонентов водной среды с лецитином (математическая обработка УФ-спектров по методу Гаусса); агрегация лецитина и величина ξ-потенциала образованных им частиц, используя метод динамического рассеяния света,

Совокупность полученных данных позволила сделать вывод, что воздействие токсикантов на биообъекты вызывает нарушение регуляции ПОЛ независимо от их природы и способа поступления в организм и является основой их токсичности.

Литература

1. Burlakova Ye,B., Pal'mina N.P., Mal'tseva Ye.L., In: *Membrane Lipid Oxidation*, Boston: CRC Press,1991, **III,** 209.
2. Шишкина Л.Н., Кушнирева Е.В., Смотряева М.А. *Радиац. биология. Радиоэкология,* 2004, **44** (3), 289.
3. Шишкина Л.Н., Козлов М.В., Повх А.Ю., Швыдкий В.О. *Хим. физика,* 2021, **40** (9), 57.
4. Shishkina L.N., Klimovich M.A., Kozlov M.V. In: *Pharmaceutical and Medical Biotechnology. New Perspectives,* N.Y.: NSP, 2014, 151.
5. Маракулина К.М., Крамор З.В., Луканина Ю.К. и др., *ЖФХ*, 2016, **90**, 182.

НОВЫЙ ФЕРМЕНТ, МЕТИЛИРУЮЩИЙ КОПРОПОРФИРИН ПРИ ПЕРЕХОДЕ МИКОБАКТЕРИЙ В СОСТОЯНИЕ ПОКОЯ

Шлеева М.О., Багаева Д.И., Демина Г.Р., Никитушкин В.Д., Савицкий А.П., Капрельянц А.С.

Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН,
119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
Email: mshleeva@inbi.ras.ru

Микобактерии способны переходить в покоящееся состояние, характеризующееся резким снижением метаболической активности, устойчивостью к повреждающим воздействиям и отсутствием деления. Такой переход *Mycobacterium tuberculosis* связывают с развитием латентного туберкулеза, который трудно поддается диагностике и лечению. Мы обнаружили, что при переходе микобактерий в состояние покоя происходит внутриклеточное накопление тетра-метилового эфира копропорфирина (4-MeCP). Предположительно, порфирины, накапливаясь в мембранах микобактерий, способствуют развитию устойчивости покоящихся форм микобактерий к неблагоприятным условиям окружающей среды (в частности, за счет стабилизации компонентов мембран). До настоящего времени фермент, участвующий в метилировании копропорфирина и образовании его тетра-метиловых эфиров был неизвестен. Целью работы являлось выявление этой метилтрансферазы микобактерий.

Были обнаружено, что при инкубации лизата микобактерий с копропорфирином в присутствии S-Аденозил-L-метионина происходит образование 4-MeCP. Путем фракционирования тотального экстракта белков микобактерий, переходящих в состояние покоя, проведения реакции метилирования с каждой белковой фракцией и дальнейшей идентификации белков с метилирующей активностью с помощью МАЛДИ-TOF анализа было выявлено 26 ферментов, предположительно метилирующих копропорфирин. Для выявления конкретной метилтрансферазы копропорфирина были получены рекомбинантные формы белков всех предполагаемых метилтрансфераз. Полученные рекомбинантные белки были оценены по их способности катализировать реакцию метилирования копропорфирина с участием в качестве субстрата S-аденозил-метионина. Белок MSMEG_0614 демонстрировал полную конверсию копропорфирина в соответствующее триметильное и тетраметильное производное. Появление пика с низкой интенсивностью, соответствующего 4-MeCP наблюдалось для белка MSMEG_0954. Были получены штаммы *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*, гиперэкспрессирующие ген метилтрансферазы MSMEG_0614 под сильным промотором GroEL. Установлено, что при гиперэкспрессии метилтрансферазы MSMEG_0614 в клетках микобактерий происходит более интенсивное накопление 4-MeCP как при переходе микобактерий в состояние покоя, так и при росте в оптимальных условиях по сравнению с контрольным штаммом. Штаммы микобактерий с гиперэкспрессией метилтрансферазы и с увеличенным содержанием 4-MeCP демонстрировали повышенную микровязкость мембран в отличие от контрольного штамма.

Таким образом, нам впервые удалось выявить ранее не описанную специфическую метилтрансферазу микобактерий, способную переносить метильные остатки на карбоксильные группы копропорфирина. Этот путь превращения копропорфиринов ранее не был описан в литературе и, возможно, является специфическим для перехода микобактерий в состояние покоя.

Работа поддержана грантом РНФ 19-15-00324

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ ЦИТОХРОМ Р450 СИСТЕМАХ

Шумянцева В.В. [а, б], **Королева П.И.** [а], **Булко Т.В.** [а], **Агафонова Л.Е.** [а]

[а] *Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 7;*
**эл. почта: v_shumyantseva@mail.ru*
[б] *Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва*

Цитохромы Р450 активно исследуются вследствие высокой функциональной и медицинской значимости. Широкая субстратная специфичность цитохромов Р450 позволяет использовать их для исследования метаболических превращений лекарственных препаратов, для получения фармакологически значимых химических соединений. Электрохимические цитохром Р450-системы активно используются как в режиме биосенсоров для регистрации субстрат-ингибиторного потенциала этого класса гемопротеинов, так и для исследования сложного и многостадийного каталитического механизма цитохромов Р450. Пока малоисследованной областью является работа цитохромов Р450 в режиме электрохимических биореакторов для электроферментативного синтеза биологически активных соединений. Целью данного исследования является разработка подходов для повышения эффективности цитохром Р450-электрокатализа. Исследованы электрокаталитические цитохром Р450 3А4 и Р450 2С9 системы как наиболее функционально-значимые изоформы в режиме перехода от 2Д к 3Д сенсору за счет включения фермента в регулярные нанопоровые мембраны анодного оксида алюминия (Anodisc 13), или порообразующего белка стрептолизина О, помещенные на рабочую поверхность электрода [1]. Биоконъюгаты с флавиновыми нуклеотидами и рибофлавином как модели электрон-транспортной цепи цитохромов Р450 исследованы в реакциях N-деметилирования макролидного антибиотика эритромицина и 4-гидроксилирования нестероидного противовоспалительного препарата диклофенака [2]. Роль флавиновых нуклеотидов заключается в регулировании потока электронов, повышении сопряжения реакции конверсии субстратов, а также внесение положительных конформационных изменений в структуру белка, также повышающих эффективность электрокатализа. Разработанные подходы позволили увеличить эффективность электрокаталитических цитохром Р450-систем на 50-200 %.

Литература
1. Шумянцева В.В., Королева П.И., Гилеп А.А., Напольский К.С., Иванов Ю.Д., Канашенко С.Л., Арчаков А.И. Доклады РАН. Науки о жизни 2022, **506**, 62.
2. Shumyantseva V.V., Koroleva P.I., Bulko T.V., Shkel T.V., Gilep A.A., Veselovsky A.V. *Bioelectrochemistry*, 2023, **149,** 108277.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00064, https://rscf.ru/project/23-25-00064/ и в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период 2021 - 2030 годы (№122030100168-2).

ДЕГРАДАЦИЯ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННУЮ ПРОДУКЦИЮ МИКОТОКСИНОВ С ПОМОЩЬЮ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Щербакова Л.А.,[а] Микитюк О.Д.[а], Назарова Т.А.,[а] Рожкова А.М.,[б] Зоров И.Н.[б]

[а]Всероссийский НИИ фитопатологии Российской Академии Наук,
1430050, Московская обл., Большие Вязёмы, ВНИИФ,
e-mail: larisavniif@yahoo.com
[б]ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии Российской Академии Наук,
119071, Москва, Ленинский проспект, 33

Контаминация зерна и другой сельскохозяйственной продукции такими опасными для теплокровных микотоксинами, как афлатоксин B1 (АФВ1), зеараленон (ЗЕН) и вомитоксин (ДОН), представляет собой серьезную проблему. Существующие физические, химические и микробиологические способы деконтаминации агропродуктов имеют ряд ограничений и не всегда эффективны. Значительный вклад в разработку надежных методов деконтаминации, которые позволяли бы сохранять питательную ценность агропродуктов, могло бы внести создание препаратов ферментов, деградирующих эти микотоксины. Источниками оксидаз, оксидоредуктаз, гидролаз и других ферментов, детоксицирующих АФВ1, ЗЕН и ДОН, трансформируя их до нетоксичных или менее токсичных соединений, могут служить некоторые ксилотрофные базидиомицеты и мицелиальные грибы, бактерии, актиномицеты и растения, а доступность различных прокариотических и эукариотических систем гетерологичной экспрессии секретируемых белков открывает возможность экономически оправданной разработки ферментных препаратов, перспективных для деконтаминации кормов и другой агропродукции.

В настоящее время рекомбинантные ферменты, способные детоксицировать указанные выше микотоксины, получены с помощью экспрессии в клетках *E. coli*, нескольких видов дрожжей и мицелиальных грибов, а также в культуре растительных клеток[1]. Наиболее эффективно действующие из этих ферментов могут инактивировать микотоксины не только в модельных растворах, но и в загрязненным ими зерне злаковых. Например, под воздействием рекомбинантной УДФ-глюкуронилтрансферазы риса, полученной в *E. coli*, происходит быстрая конверсия ДОН с образованием его менее токсичных гликозидов[2]. Наши эксперименты показали, что рекомбинантная АФВ1-оксидаза из гриба *Armillaria tabescens*, секретируемая клетками дрожжей *Pichia pastoris* GS115, в течение 48 часов способна инактивировать более 60% добавленного в инкубационный раствор АФВ1, а еще через двое суток − почти 100% этого токсина. При тестировании ЗЕН-специфичной лактонгидролазы из микромицета *Clonostachys rosea*, полученной нами с помощью экспрессии гена *zhd101* в трансформированном *Penicillium canescens* РСА-10[3], было установлено, что 16-часовая обработка препаратом этого фермента зерна пшеницы, зараженного продуцирующим ЗЕН *Fusarium culmorum*, приводит к полной очистке зерна от данного микотоксина.

Литература
1. Lyagin I., Efremenko E. *Molecules*, 2019, **24**, 2362.
2. Michlmayr H., Malachová, A., Varga E, et al. *Toxins*, 2015, **7**, 2685.
3. Shcherbakova L., Rozhkova A., Osipov D., et al. *Toxins*, 2020, **12**, 475.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 22-16-00153.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ НА СУБСТРАТАХ С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ АП-САЙТАМИ

Юдкина А.В.,[а] Булгаков Н.А.,[а] Шилкин Е.С.,[б] Болдинова Е.О.,[б] Макарова А.В.,[б] Ким Д.В.,[а] Жарков Д.О.[а,в]

[а]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, ул. Ак. Лакрентьева 8, e-mail: ayudkina@niboch.nsc.ru
[б]НИЦ «Курчатовский институт», Институт молекулярной генетики, 123182, Москва, пл. Курчатова 2
[б]Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова 2

Апурин-апиримидиновые сайты (АП-сайты) — наиболее частые спонтанные повреждения ДНК, которые образуются в геноме человека за один день в количестве около 20 000 на клетку при нормальном клеточном метаболизме и их количество увеличивается при генотоксическом стрессе. АП-сайты характеризуются гидролизом *N*-гликозидной связи, что приводит к утере основания. АП-сайты — высокотоксичные и высокомутагенные повреждения для клетки ввиду отсутствия кодирующих свойств и сильного блокирования ДНК-полимераз, кроме того они охотно реагируют с нуклеофильными группами, в результате чего может образовываться широкий спектр других производных повреждений, мутагенный потенциал которых был ранее неизвестен.

Так как ДНК постоянно ассоциирована с широким набором разнообразных белков, АП-сайты охотно образуют ДНК-белковые сшивки (ДБС), взаимодействие которых с репликативным аппаратом не до конца выяснено. Репарация ДБС в клетке неизбежно сопряжена с протеолитической деградацией белковой части до небольшого пептида, который предположительно должен проходиться ДНК-полимеразами, однако взаимодействие ДНК-полимераз с АП-сайтами, конъюгированными с пептидами, еще не было охарактеризовано. Кроме того, АП-сайты в клетке постоянно окружены низкомолекулярными нуклеофильными соединениями, такими как полиамины. Дополнительно, возможность модификации АП-сайтов нуклеофильными агентами используется в терапии онкологических заболеваний. Так, например, метоксиамин — низкомолекулярное соединение, которое проходит вторую стадию клинических испытаний как сенсибилизатор благодаря способности модифицировать АП-сайт, что ингибирует репарацию, однако его кодирующие свойства так и не были изучены.

В рамках работы мы исследовали возможность модификации АП-сайтов нуклеофильными соединениями, получили и охарактеризовали аддукты АП-сайтов с белками, пептидами, полиаминами и кенобиотиками (метоксиамином). Используя классические биохимические и биокаталитические методы мы охарактеризовали блокирующие свойства и мутагенный потенциал перечисленных модифицированных АП-сайтов и сравнили с мутагенным потенциалом истинных альдегидных АП-сайтов при синтезе ДНК-полимеразами разных семейств и вовлеченных в разные клеточные процессы: репликацию, репарацию и транслезионный синтез.

Таким образом было показано, что АП-сайты модифицируются нуклеофильными агентами, что меняет не только их мутагенные свойства при синтезе ДНК-полимеразами, но оказывает большое влияние на механизмы репарации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, грант № 21-74-00061.

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ МОДИФИКАЦИИ ФИБРИНОГЕНА ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Юрина Л.В.,[а] Васильева А.Д.,[а] Евтушенко Е.Г.,[а,б] Захарова Н.В.,[а] Индейкина М.И.,[а] Кононихин А.С.,[в] Николаев Е.Н.,[г] Розенфельд М.А.[а]

[а]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук, 119334, Москва, Косыгина, д. 4,
e-mail: lyu.yurina@gmail.com
[б]Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3
[в]Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9
[г]Сколковский институт науки и технологий, 121205, г. Москва, территория инновационного центра «Сколково», Большой бульвар, д. 30, стр.1

Болезнь Альцгеймера (БА) - это нейродегенеративное заболевание, наиболее распространенное в мире. БА поражает примерно 5% людей старше 65 лет и 20% людей старше 80 лет. Учитывая необратимый характер течения данного заболевания, проблема ранней диагностики и изучения механизмов развития БА на самых ранних стадиях является актуальной.

Взаимосвязь между структурно-химической модификацией белков и нарушением механизма их функционирования является ключевой проблемой современной биохимии, биофизики и целого ряда смежных областей знаний. В этом контексте посттрансляционные модификации (ПТМ), во многом регулирующие функции и деградацию белков, и их углубленное изучение играет значительную роль в идентификации новых биомаркеров и мишеней для лекарственной терапии. Целью данной работы было исследование ПТМ фибриногена при БА.

Образцы крови для исследования были получены от ФГБНУ “Научный центр психического здоровья” Министерства здравоохранения РФ. Всего было выбрано 16 участников контрольной группы (средний возраст 68,2 лет), 16 – с диагностированной БА (средний возраст 73,2 года).

Статистический анализ двух групп показал посттрансляционные модификации семи аминокислотных остатков (Aα цепь: 364 Ser, 530 Pro, 565 Pro, 563 His; Bβ цепь: 63 Pro; γ цепь: 122 Tyr), которые могут выступать в качестве потенциальных кандидатов – маркеров различия между контрольной группой и группой пациентов с диагностированной БА.

Таким образом, посттрансляционные модификации фибриногена были обнаружены в группе контроля и группе пациентов с диагностированной БА. Среди всех модифицированных аминокислот было получено семь кандидатов, которые показали статистическое различие между двумя группами доноров.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 21-74-00146, и бюджетного финансирования по Государственному заданию (тема 0084–2014–0001, № гос. регистрации 01201253311). В работе использовали оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

Якупова Л.Р., Копнова Т.Ю., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Россия, г. Москва ул. Ленинские Горы, д. 1
Yakupova.Linara@mail.ru

Для терапии тяжелых форм антибактериальных заболеваний широко применяются препараты группы фторхинолонов (левофлоксацин, ЛВ), карбопенемов (меропенем, МП) и цефлоспоринов (цефтриаксон, ЦТ), так как они имеют широкий спектр антибактериальной активности. Использование данных средств в клинической практике осложнено рядом недостатков, таких как ограниченная растворимость, низкая биодоступность и высокая вероятность возникновения побочных эффектов. Повысить эффективность применения антибактериальных молекул (АМ) можно путем создания систем доставок. Перспективными носителями являются β-циклодекстрины (ЦД), а также полимеры на их основе. При разработке систем доставок важно исследовать их взаимодействия с основным белком плазмы - человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) [1]. Целью данной работы - исследование влияния комплексообразования АМ с производными ЦД и их полимерами на взаимодействие АМ с ЧСА.

Методом флуоресцентной спектроскопии показано, что взаимодействие АМ с ЧСА приводит к снижению интенсивности эмиссии белка на 340 нм при увеличении концентрации АМ в растворе (pH 7,4; 37ºC). Для количественного описания тушения были рассчитаны константы связывания АМ с ЧСА, которые показывают, что более эффективное взаимодействие протекает в случае более гидрофобной молекулы ЛВ. Данное заключение подтверждается смещением положения максимума эмиссии ЧСА в длинноволновую область на 10 нм, что указывает на изменение окружения Trp на более гидрофобное. Присутствие полимерного носителя на основе ГПЦД увеличивает эффективность связывания АМ с ЧСА для всех препаратов, причем для МП и ЦТ данные изменения составляют более 3-х порядков (Таблица 1).

Таблица 1. Значения констант связывания (pH 7,4; 37ºC), M^{-1}.

Система с ЧСА	ЦТ	МП	ЛВ
–	$1.7(\pm0.1) \times 10^5$	$1.1(\pm0.1) \times 10^2$	$9.4(\pm0.3) \times 10^5$
гидроксипропил-ЦД	$2.0(\pm0.2) \times 10^5$	$3.6(\pm0.2) \times 10^4$	$3.5(\pm0.1) \times 10^5$
метил-ЦД	$3.3(\pm0.3) \times 10^5$	$9.7(\pm0.1) \times 10^3$	$8.9(\pm0.2) \times 10^4$
Полимер гидроксипропил-ЦД	$3.8(\pm0.4) \times 10^8$	$8.4(\pm0.4) \times 10^5$	$9.9(\pm0.4) \times 10^5$

Важно отметить, что при взаимодействии ЧСА с АМ наблюдается изменения во вторичной структуре белка (уменьшение α-спералей на 10-20% и увеличение неупорядоченных и β-структур). В случае инкапсуляции АМ в полимеры на основе ЦД данные изменения менее выражены.

Литература
1. Fanali G., Di Masi A., Trezza V. Human serum albumin: From bench to bedside// Molecular Aspects of Medicine. 2012 V. 33 P. 209-290.

Работа выполнена в рамках реализации гранта РНФ 22-24-00604 и стипендии Президента РФ молодым учёным и аспирантам 2022-2024, с использованием оборудования по программе развития МГУ.

KINETICS AND MECHANISM OF DEGRADATION OF THE REDOX-SENSITIVE MICROGELS: A MICROSCOPIC STUDY BY CONFOCAL MICROSCOPY

Angelina Italiano, Dr. Sergey Kazakov, Dr. Irina Gazaryan

Pace University, Department of Chemistry & Physical Sciences

Lipobeads are an emerging form of a delivery vessel for drugs and vaccines. Composed of a stimuli sensitive core surrounded by a lipid bilayer, lipobeads offer many advantages, including controlled and targeted drug release. The ability for the lipobead to release the drugs as desired may rely on how the hydrogel core degrades in the presence of a reducing agent, which in our case is glutathione (GSH). The main goals of this research are to find and conclude on the overall kinetics and the mechanism of degradation that occurs when the microgels are in the presence of GSH. Our experiment began by observing previously synthesized poly(acrylamide-co-acrylonitrile)-bis(acryloyl)cystamine fluorescently labeled microgels (PAAm-AN-BAC-FA) under the confocal microscope at different concentrations of glutathione [GSH] ranging from 1 to 91.8 mM. Using the data collected from the microscope, a method of quantification was thought out and we distinguished the phenomena accompanying the degradation (de-cross-linking, swelling, and erosion), calculated all kinetic parameters, and proposed a mechanism of degradation. The overall rate of degradation was assumed to be: $r = k[GSH]^X[RSSR]^Y = k'[RSSR]^Y$. It was found that $Y = 1$ for the decrease in fluorescence intensity (follows the concentration of non-degraded network [RSSR]), whereas the increase in microgel size (follows the cross-links density) was described by the zero-order kinetics at constant [GSH] > 2 mM. The apparent rate constant k' was almost independent of [GSH] in this range. On the contrary, the experiments at the lower [GSH] (< 2 mM) showed a strong concentration dependence of k' and no swelling of microgels. More detailed measurements at the lower [GSH] will allow us to get a clearer overall kinetics order (X + Y) of the degradation. The found characteristic times of microgels degradation and outward diffusion of uncleavable polymer chains suggest that drug release time can be controllably varied from seconds to hours. Understanding the microgel degradation mechanism is important to predict the drug release profiles which allow one to optimize drug dosage and release time, potentially making lipobeads an ideal drug delivery system.

FEATURES OF "ENZYMATIC" HYDROXYAPATITE AS A CARRIER OF YTTRIUM, COPPER AND RUTHENIUM RADIONUCLIDES IN THE FRAMEWORK OF OBTAINING NEW RADIOPHARMACEUTICALS

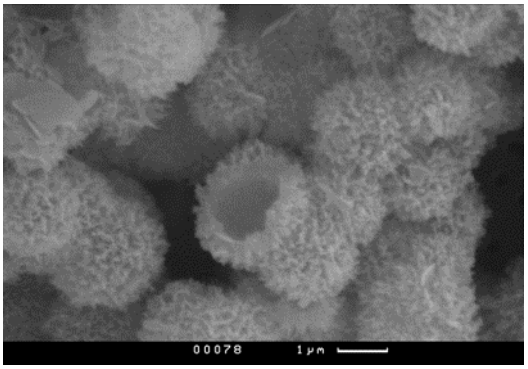
Orlova M.A., Gopin A.V., Orlov A.P., Zolotova A.S., Nikolaev A.L.

An actual problem of modern medicine is the development of methods for the treatment of oncological diseases. One of them is the method of radioembolization, which consists in introducing large solid particles of a carrier containing a therapeutic radionuclide into a blood vessel feeding the tumor. As a result, the tumor dies from both irradiation and a lack of nutrition. Hydroxyapatite obtained by the enzymatic method (HAPE) can be used as a component of the embolizer due to its a suitable particle size and sorption properties. The second component of the system should be a radionuclide abled of being actively absorbed on HAPE and having a decay scheme capable of therapeutic effect to the tumor. Yttrium-90 and copper-67 have proven themselves as therapeutic radionuclides, due to their nuclear-physical parameters.

Table**.** Approximation parameters for sorption isotherms of copper ions on hydroxyapatite according to the Langmuir model (K_L - adsorption equilibrium constant, R^2 - linearization factor)

Sample	Q_m, mg g^{-1}	K_L, l/g	R^2
Nanohydroxy-apatite	83	15.8	0.931
Enzymatic hydroxyapatite (HAP_E)	230	26.6	0.967

The table compares the parameters for HAP (nanoHAP) obtained by the conventional precipitation method and for enzymatic HAP (HAP_E) obtained with alkaline phosphatase. The dependences of particle sizes and sorption isotherms for enzymatic HAP on the concentration of the enzyme were preliminarily obtained to identify the optimal reaction conditions.



Sorption and desorption of radionuclides ^{103}Ru, ^{67}Cu and ^{90}Y on HAP_E were studied.



ПОСТЕРНЫЕ ДОКЛАДЫ

ВКЛЮЧЕНИЕ ГЛЮКОЗОДЕГИДРОГЕНАЗ В ПРЯМОЙ БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ ПОЛИАЗИНОВ ДЛЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ БИОСЕНСОРОВ

Александрович А.С., Комкова М.А., Карякин А.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1
e-mail: alexandrovichas@my.msu.ru

Возможность включения ферментов глюкозодегидрогеназ (ГДГ) в прямой биоэлектрокатализ (ПБЭК) делает их применение для глюкозных биосенсоров более перспективным, чем оксидаз, работающих в присутствии медиаторов. Одним из подходов к включению ГДГ в ПБЭК является со-иммобилизация фермента с проводящими наночастицами, обеспечивающими эффективный перенос электрона от кофактора фермента к поверхности электрода. Другим перспективным подходом является ориентация фермента на подложке, несущей фрагменты ко-субстрата фермента. Для достижения эффективности ПБЭК в работе предложено сочетать эти подходы, со-иммобилизуя ГДГ с наночастицами поли(метиленового зеленого) (поли(МЗ)).

Предложен электрохимический синтез коллоида полимерных наноструктур, которые могут быть иммобилизованы на поверхности электрода по методу drop-casting. Синтез наночастиц осуществляли на поверхности графитового электрода в ходе длительного циклирования потенциала. Согласно данным РЭМ, в ходе предложенного синтеза образуются глобулярные структуры размером 70-150 нм. Образование полимерных частиц подтверждено методом квадратно-волновой вольтамперометрии. С увеличением доли наночастиц в коллоиде на вольтамперограммах появляется и становится более интенсивным пик в анодной области, характерный для полимера МЗ.

Пирролхинолинхинон-зависимую ГДГ иммобилизовали на поверхности электродов, модифицированных наноструктурами поли(МЗ), путем адсорбции. Потенциалы наблюдаемых полуволн каталитического окисления глюкозы (-60 и 130 мВ) соответствуют последовательным редокс-превращениям пирролхинолинхинона и совпадают с потенциалами, полученными для ГДГ, включенной в ПБЭК посредством углеродных нанотрубок. Более выраженная полуволна при -60 мВ говорит о преобладании ПБЭК по отношению к медиаторному переносу электрона.

Аналитические характеристики биосенсоров исследовали в режиме хроноамперометрии. Максимальный электрокаталитический ток, зарегистрированный для биосенсора с использованием наноструктур, увеличился в 2 раза по сравнению с током для модифицированных пленок полимера. Для сенсоров на основе пленок поли(МЗ) соотношение предельных электрокаталитических токов в присутствии и отсутствии диффузионно подвижного медиатора феназина метосульфата (ФМС) составляет до 5.5, в то время как для сенсоров, созданных с использованием наночастиц поли(МЗ), оно достигает рекордных значений 2-3. Диапазон детектируемых содержаний составил 10^{-5} – 10^{-1} М. Биосенсоры были использованы для измерения глюкозы в поте. Относительное изменение концентрации глюкозы, установленное с помощью разработанного биосенсора, коррелирует с референсным значением, что позволяет использовать биосенсоры для неинвазивной диагностики диабета по поту.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 21-73-10123.

СТРУКТУРА И ДИНАМИКА СИСТЕМЫ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА-НАД, СОРБИРОВАННОЙ НА ПОВЕРХНОСТИ ГРАФИТОПОДОБНОГО СОРБЕНТА

Байгунов И.А., Холмуродов Х.Т., Гладышев П.П., Шаповалов Ю.А.

Государственный Университет «Дубна»,
141980, Московская обл., г. Дубна, ул. Университетская д.19

На сегодняшний день остается актуальным изучение взаимодействия белковых молекул с поверхностями с учетом всех факторов, таких как заряд поверхности, pH внешнего раствора и других. В последнее время наблюдается тренд по изучению данной проблемы методами компьютерной химии, в частности, особую роль приобрел метод молекулярной динамики [1]. Вычислительные методы, находящиеся на переднем крае исследований, связанных с ферментами, разрабатываются для понимания механизмов функционирования ферментов. Применительно к задачам моделирования влияния pH на ориентацию сорбции белков ранее в [2-4] было изучено сорбционное поведение фермента алкогольдегидрогеназы, исходя из конкретных взаимодействий групп белка с группами на поверхности и ее заряда. Однако, важно отметить, что сорбционные процессы для белков в большинстве случаев определяются зарядами поверхности сорбента и белковых глобул, которые являются функциями pH и при проведении тех или иных МД-моделирований вышеуказанные обстоятельства нельзя игнорировать. В настоящей работе было проведено исследование конформации алкогольдегидрогеназы и ее ориентации относительно графитоподобного сорбента в зависимости от pH раствора методом МД-расчетов. В результате проведенных вычислений была получена полноатомная модель системы «АДГ – солевой раствор – поверхность». Следует отметить, что результаты, полученные с применением современного компьютерного моделирования, полностью коррелируют с ранее полученными результатами с применением более простых подходов, не учитывающих изменения конформации алкогольдегидрогеназы при переходе из кристаллического состояния в раствор [2-4].

Литература

1. Sarah Höhn, Kai Zheng, Stefan Romeis, Martin Brehl, Wolfgang Peukert, Dominique de Ligny, Sannakaisa Virtanen, Aldo R. Boccaccini. Effects of Medium pH and Preconditioning Treatment on Protein Adsorption on 45S5 Bioactive Glass Surfaces // Adv. Mater. Interfaces 2020, 7, 2000420.
2. Гладышев П.П., Горяев М.И., Шпильберг И.Г., Шаповалов Ю.А. Сорбционная иммобилизация НАД зависимых ферментных систем. Сообщ. I. Влияние электростатических взаимодействий на ориентацию алкогольдегидрогеназы на поверхности носителя Молекулярная биология, 1982, т.16, №5, с.938-942.
3. Гладышев П.П., Горяев М.И., Шпильберг И.Г. Сорбционная иммобилизация НАД зависимых ферментных систем. Сообщ. II. Влияние гидрофобных взаимодействий на ориентацию алкогольдегидрогеназы на поверхности носителя Молекулярная биология, 1982, т.16, №5, с.943-947.
4. Гладышев П.П., Шаповалов Ю.А., Квасова В.П. Реконструированные оксидоредуктазные системы. – Наука. КазССР, 1987.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В МУЛЬТИПЛЕКСНЫХ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Бартош А.В., Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект 33,
e-mail: bartoshlab@ya.ru

Иммунохроматографические тест-системы (ИХТС) благодаря простоте и экспрессности аналитического применения активно используются для контроля самых разнообразных соединений. При этом востребованной задачей их развития является объединение на одной тест-полоске реагентов разной специфичности, позволяющее одновременно контролировать несколько соединений. Однако такое объединение изменяет условия взаимодействия иммунореагентов из-за смещения зон связывания по сравнению с монопараметрическими ИХТС, что сопряжено с рисками ухудшения аналитических характеристик. Число вариантов расположения реагентов в мультиплексных ИХТС возрастает как факториал числа контролируемых соединений, что делает их полный экспериментальный перебор весьма трудоемким. Поэтому востребованы простые критерии оценки пар антиген-антитело для выбора оптимальной геометрии тест-системы. Разработке и проверке эффективности этих критериев и было посвящено настоящее исследование.

Из-за неравновесных условий иммунных реакций аналитические параметры ИХТС зависят от констант связывания реакций антиген-антитело и продолжительности анализа. Установлено, что расположение зон связывания в порядке возрастания равновесных констант ассоциации является оптимальным и обеспечивает как более низкие пределы обнаружения, так и близкие интенсивности окрашивания различных зон связывания. Предложен простой алгоритм определения равновесных и кинетических констант иммунореагентов с использованием микропланшетного иммуноферментного анализа. На основании полученных данных установлены оптимальные расположения зон связывания в мультиплексных ИХТС для контроля антибиотиков и микотоксинов в сельскохозяйственной продукции.

Мультиплексная тест-система для одновременного контроля четырех микотоксинов, разработанная в соответствии с установленными критериями, характеризовалась пределами обнаружения 2.9 нг/мл для афлатоксина B1, 0.3 нг/мл для дезоксиниваленола, 0.8 нг/мл для токсина Т-2 и 1.5 нг/мл для охратоксина А, что соответствовало характеристикам монопараметрических тест-систем. По сравнению с вариантами неоптимального расположения зон связывания предложенный подход обеспечивал снижение пределов обнаружения от 2 (афлатоксин B1) до 27 (дезоксиниваленол) раз.

Разработанная мультиплексная тест-система для одновременного контроля трех антибиотиков позволяла выявлять линкомицин, хлорамфеникол и тетрациклин в концентрациях до 0,4, 0,4 и 1,0 нг/мл, соответственно. По сравнению с неоптимальным расположением зон связывания пределы обнаружения снизились в 5-10 раз.

Универсальность разработанного подхода позволяет его рекомендовать для решения задач одновременного иммунохроматографического контроля соединений разных классов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 19-14-00370.

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ СИСТЕМА С ДВУМЯ МАРКЕРНЫМИ КОНЪЮГАТАМИ

Баршевская Л.В., Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект 33
e-mail: lyubov.barshevskaya@yandex.ru

Предложена новая схема конкурентной иммунохроматографии, основанная на двух конкурентных иммунных взаимодействиях – с иммобилизованными и мечеными антителами – и использовании дополнительного конъюгата маркерных наночастиц с конъюгатом гаптен-белок (рис. 1а). При отсутствии антигена в пробе в аналитической зоне тест-полоски формируется комплекс (иммобилизованные на мембране антитела – конъюгат гаптен-белок-наночастица – конъюгат антитела-наночастица). Присутствующий в пробе антиген блокирует активные центры антител как на мембране, так и в составе комплекса с маркером. В результате происходит снижение интенсивности окрашивания аналитической зоны, которое благодаря двум конкурентным процессам и включению маркера в состав двух реагентов более выражено, чем в обычной конкурентной иммунохроматографии.

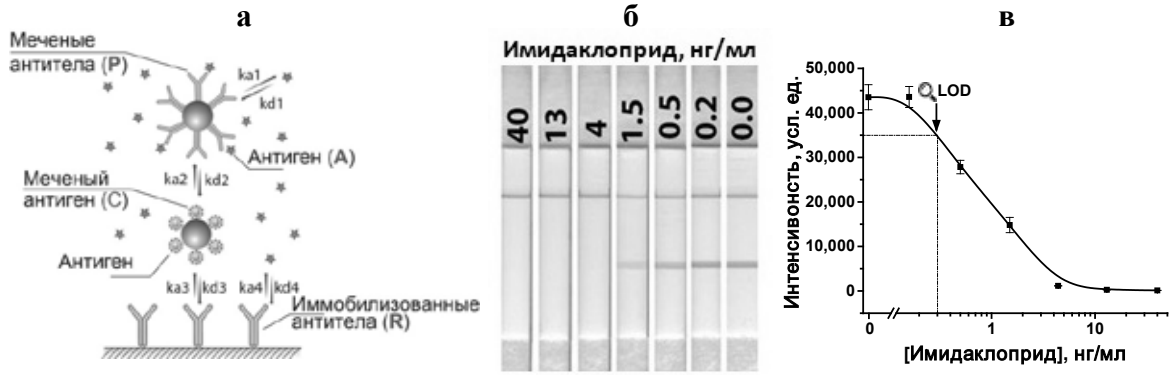


Рисунок 1. *(а) Предложенная схема проведения иммунохроматографии; (б) внешний вид тест-полосок после тестирования проб с разным содержанием имидаклоприда; (в) градуировочная кривая определения имидаклоприда*

Предложенный подход реализован на примере тест-системы для определения инсектицида имидаклоприда в меде с использованием золотых наночастиц в качестве маркеров. Синтезированы наночастицы и их конъюгаты со специфическими антителами и с конъюгатом гаптен-белок. Установлены оптимальные концентрации реагентов для проведения анализа, степень разведения тестируемых проб. Визуальный предел обнаружения имидаклоприда составил 4 нг/мл (рис. 1б), а инструментальный – 0,3 нг/мл (рис. 1в). Таким образом, использование двух маркерных конъюгатов позволяет не только снизить предел обнаружения, но и увеличить интенсивность окрашивания в аналитической зоне, повышая тем самым достоверность различения положительных и отрицательных результатов тестирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 20-76-10033.

ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ МИКРОФЛЮИДНОЙ ПЛАТФОРМЫ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

Бачева А.В.[1], Терехов С.С.[2], Мокрушина Ю.А.[1,2], Баранова М.Н.[1,2], Пипия С.О.[1,2], Смирнов И.В.[1,2]

[1] Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, кафедра ХПС
[2] ИБХ РАН имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Генетические технологии все интенсивнее применяются не только для научных исследований, но и в медицине. Они критически важны для диагностики целого ряда заболеваний, их профилактики, и все чаще используются для терапии различных патологий. Молекулярно-генетический анализ (генодиагностика) с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования используется для детекции, а также для определения риска развития многих широко распространенных заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых, эндокринных, аутоиммунных и др. Для профилактики инфекционных заболеваний широкое применение нашли генно-инженерные вакцины, которые содержат только антигены возбудителей, полученные с использованием методов генной инженерии, и включают преимущественно компоненты с низкой патогенностью, но высокой иммуногенностью, что способствует формированию длительного защитного иммунитета. Для иммунотерапии рака применяются противоопухолевые вакцины, доказавшие свою эффективность для определенной группы пациентов, а создание терапевтических моноклональных антител осуществляется с помощью генетических технологий. Ведутся разработки в области CAR-T-терапии и генотерапевтических препаратов на основе рекомбинантных адено-ассоциированных вирусов. Иммунотерапия применяется и для лечения некоторых видов аутоиммунных заболеваний. Разработанную нами микрофлюидную платформу возможно использовать для обнаружения новых антител, специфичных к опухолевым мишеням, с последующим РНК-секвенированием отдельных клеток. Для терапии бактериальных инфекций необходимы антибиотики, поэтому поиск новых антибактериальных препаратов является важнейшей задачей. Устойчивость к антибиотикам у бактерий может быть преодолена, если вместо антибиотиков применять бактериолитические ферменты, либо лантипептиды. С помощью разработанной нами микрофлюидной платформы были обнаружены несколько бактерий-антагонистов, способных подавлять рост грамположительных и грамотрицательных бактерий. Геномное секвенирование некоторых штаммов бактерий-антагонистов позволило выявить кластер биосинтеза лантибиотика III класса, продуктом биосинтеза которого является смесь лантипептидов. При профилировании микробиома ротовой полости енотовидной собаки был отобран штамм *Staphylococcus pseudintermedius*, с высокой специфичностью подавлявший рост культуры *S.aureus*. Это ингибирование, как показали геномный и метаболомный анализ штамма, обеспечивалось новым бактериолитическим белком, ближайшим известным гомологом которого являлся лизостафин. Обнаруженный фермент был назван ритафином и для подтверждения активности получен в гетерологической системе и подробно изучен. С помощью биоинформатических методов были обнаружены и другие схожие белки, которые были наработаны, очищены и их литическая активность была проверена на целой панели патогенных бактерий. Два белка проявляли ингибирующую активность в отношении *S.aureus* и *E.coli.*

Работа поддержана грантом РНФ 19-14-00331-П.

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ *OGATAEA PARAPOLYMORPHA*

Безпалая Е.Ю.,[а] Родина Е.В.,[а] Курилова С.А.,[б] Воробьева Н.Н.[б]

[а]Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1
e-mail: bezpalaya.katya@gmail.com
[б]НИИ ФХБ МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1

Митохондриальная изоформа неорганической пирофосфатазы (PPA2) у дрожжей и человека играет важную роль в аэробном метаболизме [1]. Структура митохондриальных пирофосфатаз пока не решена экспериментально. Настоящая работа направлена на решение актуальной биохимической задачи: выяснения структурных особенностей фермента для понимания принципов его функционирования и регуляции.

Основным объектом данной работы является митохондриальная пирофосфатаза дрожжей *Ogataea parapolymorpha* (OpPPA2), имеющая высокую схожесть с ферментом человека. Биохимические и структурные исследования показывают, что динамическое поведение OpPPA2 может играть важную роль в регуляции ее активности. Гомологичным моделированием была получена пространственная структура этого фермента и проведена симуляция молекулярной динамики. Согласно ее результатам, субъединицы димера в растворе принимают различные конформации. Установлено, что диссоциация димера OpPPA2 на мономеры сопровождается значительным снижением каталитической активности. Симуляция молекулярной динамики мономера и димера OpPPA2 позволила предположить путь передачи информации из межсубъединичного интерфейса в активный центр. Также структурный анализ позволил найти возможные сайты связывания недавно обнаруженных аллостерических активаторов фермента, NADH и ATP, в молекуле фермента. Однако выдвинутые предположения нуждаются в экспериментальном подтверждении.

С этой целью предполагается использовать ЯМР спектроскопию. Этот метод позволит решить структуру фермента, охарактеризовать его динамические свойства, а также экспериментально определить сайты связывания найденных эффекторов. Получение белка, который можно исследовать с помощью ЯМР, состоит из нескольких стадий изотопного мечения. К настоящему моменту мы получили генно-инженерную экспрессирующую OpPPA2 культуру клеток *E. coli*, адаптированную к росту в минимальной среде, приготовленной на D_2O и содержащей $^{15}NH_4Cl$ в качестве единственного источника азота.

Таким образом, результаты расчетной и биохимической части нашей работы позволили выдвинуть предположения о возможных путях регуляции активности Op-PPA2 и структурных особенностях ее работы. Эти предположения планируется проверить с помощью метода ЯМР.

Литература
1. Kennedy H., Haack T.B., Hartill V., et al. Sudden Cardiac Death Due to Deficiency of the Mitochondrial Inorganic Pyrophosphatase PPA2 // Am J Hum Genet. 2016. Vol. 99(3). P. 674-682.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 23-24-00177.

ЭКСПРЕССНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИБУТИЛФТАЛАТА В ВОДЕ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Берлина А.Н., Рагозина М.Ю., Серебренникова К.В., Комова Н.С., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха,
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук,
119991, Москва, Ленинский проспект 33,
e-mail: anberlina@yandex.ru

Эфиры фталевой кислоты, используемые в качестве пластификаторов при производстве упаковочных, строительных и других материалов, способны проникать в окружающую среду и оказывать эстрогеноподобное действие на организменном уровне. В связи с имеющимися данными о токсичности различных представителей этого класса и допустимых уровнях содержания данные соединения необходимо определять в воде и продуктах питания с целью оценки безопасности пищевой продукции. Для скрининга большого числа проб необходимо наличие тест-систем, обеспечивающих высокую чувствительность, специфичность, точность и быстроту анализа. Этим требованиям отвечают иммунохимические тест-системы. Целью данного исследования была разработка иммунохроматографической и кинетической иммуноферментной тест-систем для определения дибутилфталата (ДБФ).

Разработанная впервые иммунохроматографическая тест-система для определения ДБФ в воде основана на принципе конкурентного взаимодействия, при котором конъюгат гаптен-белок иммобилизован на поверхность мембраны, а находящийся в пробе аналит взаимодействует с антителами, конъюгированными с золотыми наночастицами размером 12 нм. Работа включала получение иммунореагентов, выбор условий взаимодействия, иммунохроматографических мембран, исследование селективности, изучение характеристик среды для получения надежного сигнала в течение 15 минут. Предел обнаружения ДБФ составил 33,4 нг/мл, а рабочий диапазон определяемых концентраций – от 42,4 до 1500 нг/мл. Результаты демонстрируют успешное обнаружение дибутилфталата в природных водах с извлечением от 75 до 115%.

Разработан кинетический иммуноферментный анализ (ИФА) для определения ДБФ во фруктовых соках. В качестве метки использована традиционно используемая пероксидаза хрена, выбранная детекция – колориметрическая. Проведено изучение и сравнение аналитических характеристик метода, включая предел обнаружения аналита и рабочий диапазон определяемых концентраций, при использовании различных кинетических режимов анализа. Выбраны оптимальные параметры анализа – длительность конкурентной стадии взаимодействия составляла 30 мин, а общая продолжительность анализа не превышала 45 мин. Диапазон определяемых концентраций ДБФ составил от 0,37 до 68,34 нг/мл; предел обнаружения – 0,08 нг/мл. Выбран режим экстрагирования ДБФ, для которого показана эффективность предложенного ИФА в соках цитрусовых с извлечением от 75 до 98%.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-14-00306).

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ АМИЛОИДОВ ДРОЖЖЕВОГО БЕЛКА SUP35 МЕТОДАМИ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Бурцева А.Д.,[а,б] Баймухаметов Т.Н.,[в] Моисеенко А.В.,[г] Дергалев А.А.,[а] Кушниров В.В.,[а] Бойко К.М.[а]

[а]Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33с2, e-mail: a.burtseva@fbras.ru
[б]Московский физико-технический институт (НИУ)
[в]НИЦ "Курчатовский институт"
[г]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Прионы являются инфекционным подклассом амилоидов - фибриллярных белковых агрегатов с характерной кросс-β-структурой. Образование амилоидов является причиной возникновения ряда нейродегенеративных заболеваний человека, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона. Лишь один белок млекопитающих, PrP, обладает прионными свойствами, в то время как десять прионных белков обнаружено у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [1]. Последние, и в особенности белок Sup35, являются удобной моделью для изучения общих структурно-функциональных свойств прионов и амилоидов. Конформационное разнообразие амилоидных структур лежит в основе существования штаммовых вариантов прионной формы белка Sup35, которые согласно данным протеазного картирования делят на две условные категории: сильные (S) и слабые (W) [2,3].

Пространственная структура Sup35 не установлена, а существующие модели - противоречивы [3]. В отличие от классических методов структурной биологии просвечивающая криоэлектронная микроскопия (крио-ЭМ) позволяет реконструировать структуру амилоидных фибрилл с высоким уровнем детализации [4].

Данная работа посвящена исследованию пространственного строения прионного белка Sup35, выделенного *ex vivo* из дрожжей *S. cerevisiae*, методом крио-ЭМ. В рамках работы были проведены эксперименты по негативному контрастированию варианта W белка Sup35, получена реконструкция фибриллы с низким разрешением, демонстрирующая характерные признаки спиральной структуры, а также оценены диаметр фибриллы (~100 Å) и шаг ее спирали (~250 Å), которые совпали в пределах погрешности с результатами, полученными альтернативными методами. КриоЭМ данные показали наличие вокруг амилоидных фибрилл плотной "шубы", образованной молекулами GFP, ковалентно пришитыми к Sup35 для упрощения процедуры выделения. Двумерная классификация проекций фибрилл показала, что наличие GFP препятствует реконструкции структуры с высоким разрешением. В настоящее время ведется работа по получению препаратов с отщепляемым GFP для дальнейших структурных исследований.

Литература
1. Alberti S., Halfmann R., King O. et al. *Cell*, *137*, 146–58 (2009).
2. Derkatch I.L., Chernoff Y.O., Kushnirov V.V. et al. *Genetics*, *144*, 1375–86 (1996).
3. Dergalev A.A., Alexandrov A.I., Ivannikov R.I. et al. *Int. J. Mol. Sci. 20*, 2633 (2019).
Eisenberg D. S., Saway M. R. *Annual Review of Biochemistry* 86, 69-95 (2017).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, грант № 23-74-00062.

СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЛИГАНДОВ НА ВАЖНЫЕ КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Гершкович К.Б. [2], **Айсина Р.Б.** [1], **Мухаметова Л.И.**[1], **Иванова Е.М.** [1]

[1]ФГБОУ Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия
[2]ФГБУ науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д.4, gkb-09@mail.ru

Введение. В последнее время в медицине интенсивно расширяется применение наноматериалов для целевой доставки лекарств, диагностики и лечения различных заболеваний, в том числе онкологических. Большой интерес вызывают полиамидоамин (PAMAM) дендримеры (G) – сферические монодисперсные полимеры с высоко разветвленной трехмерной структурой и заряженными функциональными группами на поверхности (-NH_2, -OH или –COOH) и пара-сульфонато каликс(n)арены (CnS) - макроциклические соединения, состоящие из нескольких фенольных колец, связанных метиленовыми мостиками, и содержащие заряженные радикалы в пара-положении. Оба типа лигандов обладают набором биологических функций. При введении в кровоток они могут взаимодействовать с сосудистой стенкой, образовывать комплексы с белками и другими компонентами крови, и, следовательно, нарушать баланс в системе гемостаза. Изучение их свойств необходимо для возможности безопасного применения.

Цель. Сравнение влияния PAMAM–COOH дендримеров низкой генерации (G 3,5) и C(6)S на главные компоненты свертывающей и фибринолитической систем выполнено с целью оптимального выбора лиганда в зависимости от поставленной задачи

Методы. Оценка общего гемостатического потенциала плазмы (ОГП), анализ спектров флуоресценции фибриногена (Fg) и плазминогена (Glu-Pg), определение собственной активности тромбина (T), Glu-Pg, тканевого активатора плазминогена (tPA); анализ tPA-индуцированной скорости активации Glu-Pg.

Результаты. На кривых ОГП анионные дендримеры снижали высоту пика и его общую площадь, не удлиняя лаг-период и положение максимума. C(6)S незначительно уменьшал пик коагуляции при 25-50 мкМ, а при концентрациях выше 100 мкМ катастрофически увеличивал время достижения пика, снижал скорость образования и количество образованного фибрина. G3,5 слабо влиял на конформацию Fg, а C(6)S. вызывал сильное снижение интенсивности флуоресценции ($Ksv=1,1*10^4$ M^{-1}). G3,5 и C(6)S вызывали дозо-зависимое снижение интенсивности пика на спектрах флуоресценции Glu-Pg при 340 нм, что указывает на изменения в микроокружении остатков Trp и конформации белка. Вычисленная Ksv для C(6)S почти в 10 раз больше Ksv для G3,5. Оба эффектора угнетали активность тромбина, но по разному типу ингибирования. G3,5 не влиял на активность плазмина во всем исследуемом диапазоне концентраций, но заметно снижал амидолитическую активность tPA(~на 30% при 300мкМ). В отличие от него C(6)S существенно снижал активность плазмина и сильнее влиял на tPA. Оба лиганда снижали скорость tPA-индуцированной активации Glu-Pg.

Заключение. Оба лиганда проявляют антикоагулянтное действие. Их можно рассматривать как потенциальных носителей для системной доставки лекарств, но с учетом концентрационных эффектов на структуру и функцию циркулирующих белков системы гемостаза.

Работа выполнена за счет:1) средств Госрегистрационной темы АААА-А21-121011290089-4 и 2) Темы Проекта 44.2 № НИОКР 122041300210-2

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ЦИКЛИЧЕСКОГО ЛАБОРАТОРНОГО БИОРЕАКТОРА ОСУЩЕСТВЛЯЮЩЕГО УДАЛЕНИЕ ФОСФАТОВ

Груздев Е.В., Белецкий А.В., Пелевина А.В., Каллистова А.Ю., Дорофеев А.Г., Пименов Н.В., Равин Н.В, Марданов А.В.

ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., д. 33, стр. 2,
e-mail: gruevg@ya.ru

Фосфат-аккумулирующие организмы (ФАО) широко применяются для биологического удаления фосфора из загрязненных вод на очистных сооружениях. Для моделирования этих процессов используются лабораторные реакторы с циклической сменой аэробных и анаэробных условий. Анаэробный этап работы биореактора сопряжен с потреблением из среды органических соединений, преимущественно летучих жирных кислот для накопления полигидроксиалканоатов, используемых на аэробном этапе, в ходе которого происходит поглощение из среды фосфатов и синтез полифосфатов. В большинстве исследований как ключевой ФАО рассматривался *Candidatus* Accumulibacter, однако в последние годы в данную группу отнесены и ряд других бактерий. Также продемонстрировано, что одновременное протекание фосфат-аккумуляции и денитрификации позволяет не только удалять из среды и нитраты, но и усиливать процессы фосфат-аккумуляции. Бактерии, осуществляющие оба процесса, относятся к группе денитрифицирующих фосфат-аккумуляторов (ДФАО).

Основным объектом было микробное сообщество фосфат-аккумулирующего активного ила из лабораторного биореактора, который был запущен в июне 2020 года и работает до настоящего времени. На основе анализа последовательностей генов 16S рРНК показано, что в процессе работы происходит сукцессия сообщества, в котором доминирующими группами становятся ФАО. В результате метагеномного анализа были собраны и проанализированы геномы основных групп микроорганизмов. Получены геномы ФАО и ДФАО, которые относились к *Gammaproteobacteria* (семейство *Rhodocyclaceae*) и *Alphaproteobacteria*. К потенциальным ФАО отнесены *Accumulibacter* IIB, *Amaricoccus*, а к потенциальным ДФАО - *Accumulibacter* IC и IIC, *Azonexus*, *Thauera*, *Zoogloea*, *Pinisolibacter* и *Siculibacillus*.

В собранных геномах ФАО и ДФАО были идентифицированы ключевые гены процессов фосфат-аккумуляции и денитрификации. Во всех ФАО были обнаружены ключевые гены транспорта летучих жирных кислот и синтеза полигидроксиалканоатов (*actP, asc, ackA, pta, phaA, phaB, phaC, phaZ*), транспорта фосфатов (*pit, pstA, pstB, pstC, pstS*), синтеза и расщепления полифосфатов (*ppk1, ppx*) и гликогена (*glgA, glgB, glgC, glgP*). Геномы ДФАО содержали гены пути денитрификации (*nap/nar, nirS, norB, norC, nosZ*). Полученные данные являются основой для совершенствования биотехнологий удаления фосфатов из сточных вод.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект 21-64-00019).

ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА B1-INUPEL НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* B1-INUPEL, С ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ЭКЗО-ИНУЛИНАЗЫ И ПЕКТИНЛИАЗЫ

Денисенко Ю.А., [а] **Милова Е.С.,** [б] **Ярошенко Е.В.**[в]

[а] *Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071, РФ, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2*
e-mail: denisenkoyura@mail.ru
[б] *Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, 119991, РФ, г. Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 11*
[в] *ООО «ИстАгро Дон», 399850, РФ, Липецкая область, г. Данков, ул. Экономическая д.2*

Одним из способов получения фруктозо-глюкозных сиропов (ФГС) является ферментативная обработка экстрактов клубней топинамбура, в которых содержится инулин. Инулин представляет собой полисахарид β-D-фруктозы, на восстанавливающем конце которого расположен остаток β-D-глюкозы. Ферментативный гидролиз инулина экзо-инулиназой позволяет получить ФГС высокого качества с содержанием фруктозы до 95%. Также в клубнях топинамбура содержатся пектины и целлюлозные полисахариды. Присутствие пектина в значительной мере осложняет стадию микрофильтрации в технологическом процессе получения ФГС, поскольку пектин образует пектиновую матрицу и увеличивает вязкость раствора. Совместное применение экзо-инулиназы и пектинлиазы позволит снизить нагрузку на технологическое оборудование и увеличить выход фруктозы за счет разрушения пектиновой матрицы.

Для получения необходимого штамма-продуцента была произведена трансформация лабораторного штамма-реципиента *Penicillium verruculosum* B1-537 двумя плазмидами, несущими гены гетерологических экзо-инулиназы *Aspergillus awamori* и пектинлиазы *Penicillium canescens*. После культивирования был получен ферментный препарат ФП B1-InuPel, обладающий обеими целевыми активностями. Применение ФП B1-InuPel обеспечивало увеличение выхода восстанавливающих сахаров при гидролизе экстракта топинамбура на 10% по сравнению с контрольным ФП-Топилаза, который применяется в настоящее время на производствах. Применение ФП B1-InuPel позволило снизить вязкость раствора экстракта топинамбура на 12-20% по сравнению с контрольным ФП-Топилаза. Важным является тот факт, что ФП B1-InuPel полностью гидролизовал экстракт топинамбура до моносахаридов – фруктозы и глюкозы, что было подтверждено изучением продуктов гидролиза экстракта топинамбура с помощью ВЭЖХ.

СЕНСОРНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ЭЛЕКТРОДОВ, ОБЪЕДИНЕННЫХ СЛОЕМ ОКСИДА ГРАФЕНА, ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОЙ ЭКСПРЕСС-ДЕТЕКЦИИ H_2O_2 В ВЫДЫХАЕМОМ АЭРОЗОЛЕ

Дубов Л.А., Комкова М.А., Карякин А.А.

МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3
E-mail: leo.dubov@gmail.com

Неинвазивные методы диагностики и мониторинга являются перспективным направлением современной медицины. Одним из важнейших объектов неинвазивной диагностики является конденсат выдыхаемого воздуха (КВВ), который содержит такой маркер как H_2O_2, по концентрации которого можно проследить наличие или тяжесть пульмонологических заболеваний. В клинической диагностике при отборе КВВ используются громоздкие установки, которые разбавляют выдыхаемый аэрозоль охлажденным до -78°C водяным паром. Целью данной работы является разработка сенсорной системы анализа аэрозоля в момент выдоха без дополнительного охлаждения.

В качестве основы разрабатываемой системы использованы электрохимические сенсоры на основе берлинской лазури (БЛ) как наиболее селективные и чувствительные в своем классе [1]. С целью обеспечения проводимости второго рода между электродами, планарную структуру, состоящую из рабочего электрода на основе БЛ и хлоридсеребряного электрода сравнения (ХЭС), покрывали слоем твердого электролита или ионной жидкости, а затем мембраной на основе оксида графена (ОГ). В условиях влажного воздуха ОГ обеспечивает улавливание и аккумуляцию аэрозоля за счет эффекта капиллярной конденсации.

Согласно данным ЦВА, максимальная электроактивность БЛ достигается в течение 15 с пропускания аэрозоля, при этом расстояние между пиками снижается с 300 до 30 мВ.

Разработанная сенсорная система может функционировать в режиме гальванической ячейки, где в качестве аналитического сигнала выступает изменение стационарного тока короткого замыкания электрода на основе БЛ с ХЭС [2]. Использование покрытия на основе ОГ позволяет понизить предел обнаружения на 3 порядка величины, и обеспечивает высокую скорость отклика - менее 15 с.

Литература
1. Karyakin A.A. Advances of Prussian Blue and its analogues in (bio)sensors // Curr. Opin. Electrochem. 2017. P. 5.
2. Komkova M.A., Karyakina E.E., Karyakin A.A. Noiseless Performance of Prussian Blue Based (Bio)sensors through Power Generation // Anal. Chem. 2017. Vol. 89. P. 6290-6294.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, грант №21-73-10123.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫСОКОАКТИВНОЙ МУТАНТНОЙ ФОРМЫ ТЕРМОФИЛЬНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ *THERMOCOCCUS SIBIRICUS* ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Думина М.В.,[а] Жданов Д.Д.,[а] Жгун, А.А.,[а] Покровская М.В.,[б] Александрова С.С.,[б] Веселовский А.В.,[б] Эльдаров М.А.[а]

[а] Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 117312, Москва, Проспект 60-летия Октября, 7/1, e-mail: DuminaMaria@gmail.com

[б] Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, Москва, Погодинская, 10, стр.8

L-аспарагиназа (L-АСП) – первый фермент с противоопухолевой активностью, одобренный к применению в клинической практике и являющийся основой терапии острого лимфобластного лейкоза и ряда чувствительных видов опухолей. Относительно недавно сфера биотехнологического применения фермента была расширена. Обнаружено, что L-АСП эффективно снижает содержание канцерогена акриламида, образуемого в пищевых продуктах при температурах свыше 120°C. Поскольку применяемые препараты мезофильных L-АСП обладают невысокой активностью при температурном оптимуме порядка 30–40°C и низкой стабильностью, возрос интерес к L-АСП термофильного происхождения. Термо-АСП способны не только занять вакантную нишу высокотемпературных пищевых технологий, но и составить конкуренцию мезофильным L-АСП в биомедицине.

Ранее нами была изучена L-АСП из гипертермофильной археи *Thermococcus sibiricus* (TsA). Показано, что оптимуме 90°C фермент проявляет высокую активность, стабильность и цитотоксическую активность *in vitro*.

Целью данной работы стало получение и характеристика мутантной формы TsA с повышенной специфической активностью.

На основании множественного выравнивания аминокислотных последовательностей выявлено, что субстрат-связывающий Ser высоко консервативен в L-АСП независимо от их происхождения и типа. Однако примыкающие к нему остатки у мезофильных и термофильных L-АСП различаются. Основываясь на результатах компьютерного моделирования, что триада, включающая субстрат-связывающий Ser, – GSQ для мезо-АСП либо DST для термо-АСП – оптимизирована для эффективного связывания субстрата, был сконструирован двойной мутант термофильной L-АСП TsA с мезофильно-подобной комбинацией GSQ. Гетерологическая экспрессия TsAmut проводилась в штамме-продуценте *Escherichia coli*. Очищенный с помощью ионообменной хроматографии фермент проявлял максимальную активность при 90°C, достигающую 240% от активности фермента дикого типа. При этом при физиологических значениях температуры активность TsAmut также превысила значение для фермента дикого типа более чем в 2 раза, что привело к усилению его цитотоксической активности *in vitro*.

Таким образом, выявлено, что повышающая активность мезофильно-подобная комбинация GSQ в жесткой структуре TsA, по-видимому, более эффективна в достижении баланса связывания субстрата и конформационной гибкости фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-10100, https://rscf.ru/project/22-74-10100/) в Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

РОЛЬ ТЕТРАМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ В РЕГУЛЯЦИИ CBS-ПИРОФОСФАТАЗ НУКЛЕОТИДАМИ

Замахов И.М., Анашкин В.А.

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 40,
E-mail: izmozi1999@gmail.com

Нуклеотид-связывающие регуляторные CBS-домены (названные по ферменту cystathionine β-synthase) найдены во многих белках, в том числе участвующих в патогенезе наследственных заболеваний. CBS-домены имеют высокое сродство к производным аденозина и опосредуют аллостерическую регуляцию активности ряда ферментов и транспортных белков. Молекулярный механизм регуляции не установлен, поскольку сложная многодоменная структура и характерная конформационная подвижность CBS-содержащих белков затрудняет получение структурной информации.

Удобным модельным объектом для установления механизма регуляции CBS-содержащих белков является CBS-пирофосфатаза (CBS-PPаза), не имеющая пост-трансляционных модификаций. Она осуществляет гидролиз пирофосфата – побочного продукта большинства биосинтетических реакций, и состоит из двух каталитических доменов – DHH и DHHA2, и регуляторной части, содержащей пару CBS-доменов [1]. Активный центр расположен между каталитическими доменами. Связывание AMP и ADP в регуляторной части ингибирует, а связывание ATP и Ap_nA (n = 3−6) активирует фермент. CBS-PPазы являются гомотетрамерами со сложными межсубъединичными контактами регуляторных и каталитических частей [2]. Известно также, что в каталитическом цикле фермента происходит движение DHHA2-домена. На основании этих данных была предложена гипотеза, согласно которой DHHA2-домен выступает конечным акцептором регуляторного сигнала, генерируемого при связывании эффекторов CBS-доменами. Целью данной работы была проверка этой гипотезы.

С помощью программы AlphaFold-multimer были получены структурные модели CBS-PPазы из *Desulfitobacterium hafniense* и ее мутантной формы с делецией DHHA2-домена. Методом полноатомной молекулярной динамики в явном растворителе были произведены симуляции (в несколько сотен нс) для комплексов форм белка с активатором (Ap_4A) или ингибитором (AMP). Анализ траекторий с использованием широкого набора метрик показал правильность построения модели олигомерной структуры белка и подтвердил значимую роль DHHA2-домена в регуляции активности фермента.

Литература

1. Baykov A.A., Anashkin V.A., Salminen A., Lahti R. Inorganic pyrophosphatases of Family II: two decades after their discovery // FEBS Letters. 2017. Vol. 591. 20. P. 3225-3234.
2. Anashkin V.A., Salminen A., Orlov V.N., Lahti. R., Baykov A.A. The tetrameric structure of nucleotide-regulated pyrophosphatase and its modulation by deletion mutagenesis and ligand binding // Arch. Biochem. Biophys. 2020. Vol. 692. 108537. P. 1-10.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-74-00031.

ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА В РЕАКТОРАХ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ СУБСТРАТОВ И ТЕМПЕРАТУРЫ

Кадников В.В., Ёлкина Ю.А., Белецкий А.В., Меламуд В.С., Булаев А.Г., Равин Н.В., Марданов А.В.

ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., д. 33, стр. 2, e-mail: vkadnikov@bk.ru

Для переработки золотосодержащих концентратов широко применяются биогидрометаллургические технологии (биоокисление), основанные на деструкции сульфидных золотосодержащих минералов (пирита, арсенопирита) микроорганизмами. Существует ряд проблем, снижающих эффективность биопереработки сульфидных концентратов, например, окисление сульфидных минералов приводит к выделению тепла, и в свою очередь, к перегреву пульпы реакторов и подавлению биологических процессов. Поэтому важной задачей является разработка подходов, которые могут позволить минимизировать негативное влияние перегрева на процессы биоокисления сульфидных концентратов.

Мы исследовали влияние дополнительных источников углерода на микробное сообщество в процессе непрерывного биоокисления золотосодержащего пирит-арсенопиритного флотационного концентрата. Биоокисление проводили в лабораторных реакторах в непрерывном режиме при 40, 45 и 50°C, время культивирования составило 6 суток. Меласса или CO_2 добавлялись в качестве источника углерода в два биореактора, а третий использовался в качестве контроля. Результаты профилирования по генам 16S рРНК показали, что при 40°C добавление источников углерода практически не влияло на состав микробных сообществ. При 45°C относительное содержание *Acidithiobacillus, Ferroplasma* и *Acidiplasma* увеличилось во всех трех реакторах. Добавление CO_2 также увеличивало долю архей Cuniculiplasma и A-plasma. При 50°C в сообществах доминировали *Acidithiobacillus, Sulfobacillus* и *Acidiplasma*. Примечательно, что при 45°C и 50°C общая концентрация микробных клеток в реакторе с добавлением CO_2 была в 2-3 раза выше, чем в других биореакторах. Из метагенома были собраны геномы *Acidithiobacillus caldus* и пяти архей филума *Thermoplasmatota*. Анализ этих геномов позволил реконструировать центральный метаболизм соответствующих микроорганизмов и выявить основные гены, ответственные за биовыщелачивание золотосодержащего пирит-арсенопиритного концентрата. В микробных сообществах биоокисление сульфидных минералов происходило, главным образом, за счет активности *Acidiplasma sp., Sulfobacillus, Ferroplasma* и *Acidithiobacillus caldus*. Полученные данные о влиянии различных источников углерода и температуры на состав микробного сообщества, осуществляющего биоокисление сульфидных концентратов, являются основой для повышения эффективности процесса биовыщелачивания за счет целенаправленного воздействия на сообщество.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда № 21-64-00019

ПОДАВЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО РЕДОКС-СТАТУСА, СИГНАЛЬНОГО ПУТИ PI3K-AKT-mTOR И ПРЕОДОЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ЦИСПЛАТИНУ ПРИ ДЕЙСТВИИ КУРКУМИНА

Хасан А.А.Ш.[1], Калинина Е.В. [1], Татарский В.В.[2], Володина Ю.Л.[3], Петрова А.С. [2], Новичкова М.Д. [1], Жданов Д.Д. [1], Нурмурадов Н.К. [1], Чернов Н.Н. [1], Штиль А.А.[3]

[1] Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6, РФ; kalinina-ev@rudn.ru;
[2] Институт биологии гена Российской Академии наук, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5; РФ;
[3] Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава РФ, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, РФ

Химиотерапевтический потенциал куркумина, растительного полифенола, обладающий антиоксидантным и антипролиферативным действием, установлен для различных типов злокачественных новообразований. Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния куркумина на устойчивость клеток аденокарциномы яичников SKOV-3 и изогенной резистентной сублинии SKOV-3/CDDP к противоопухолевому препарату цисплатину (CDDP), клеточный редокс-статус и сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR.

Оценка экспрессии генов сигнального пути PI3K/Akt/mTOR в клетках SKOV3 и SKOV-3/CDDP позволила установить, что формирование устойчивости сопровождается значительным повышением мРНК PI3K, Akt и mTOR. Напротив, действие куркумина (17 мкМ, 24 ч) приводит к резкому снижению экспрессии генов не только сигнального пути PI3K/Akt/mTOR, но и ключевых антиоксидантных ферментов – Cu,Zn- и Mn-супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы 1, гемоксигеназы 1, (*SOD1, SOD2, CPX1, HO1*), а также транскрипционного фактора Nrf2, контролирующего их экспрессию, в резистентной сублинии SKOV3/CDDP по сравнению с клетками дикого типа SKOV3.

Куркумин вызывает зависимое от концентрации и времени инкубации снижение жизнеспособности как родительских, так и устойчивых к CDDP клеток и нарушает распределение фаз цикла, повышая долю клеток в G2/M. Однако этот эффект по-разному реализуется: для SKOV-3 доля гибнущих клеток (subG1) нарастает, тогда как у SKOV-3/CDDP вызванная куркумином задержка в G2/M не сопровождается повышением накопления клеток в subG1. Инкубация клеток SKOV-3/CDDP с куркумином при нетоксичной концентрации 17 мкМ (24 час) приводила к повышению их чувствительности («обращению» резистентности) к CDDP, снижая IC_{50}.

Результаты работы свидетельствуют о куркумин-зависимом подавлении антиоксидантной защиты резистентных клеток SKOV3/CDDP за счет значительного снижения экспрессии генов ключевых антиоксидантных ферментов и Nrf2. Высокий уровень экспрессии генов антиоксидантной защиты характеризует становление устойчивости клеток SKOV-3 к CDDP – соединению с прооксидантной активностью. В комбинации с куркумином цислатин эффективно действует на клетки SKOV-3/CDDP, наблюдается эффект «обращения» лекарственной устойчивости. Вызываемый куркумином сдвиг редокс-статуса, вероятно, может быть причиной снижения экспрессии генов сигнального пути PI3K/Akt/mTOR. С учетом этого подавление PI3K/Akt/mTOR пути, контролирующего пролиферацию опухолевых клеток, вызывает дисрегуляцию клеточного цикла и торможение в G2M фазе в большей степени у чувствительных SKOV3 клеток, тогда как у резистентных этот процесс тормозится изначально высоким уровнем антиоксидантной защиты.

СИСТЕМА ЛЮЦИФЕРИН-ЛЮЦИФЕРАЗА СВЕТЛЯКОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ АНТИБИОТИКОВ НА ЖИВЫЕ КЛЕТКИ

Каминская С., Ломакина Г.Ю., Угарова Н.Н.

Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, 119992, Ленинские Горы, МГУ, 1/11, lomakinagalina@yahoo.com

Оптимизирован метод быстрого определения эффективности действия гентамицина - антибиотика аминогликозидного ряда, на клетки *E. coli*, экспрессирующие термостабильную люциферазу светляков *L. mingrelica*. Данная тест-система позволяет в режиме реального времени дифференцированно определять изменение содержания АТР и люциферазы внутри и вне клеток. Для определения люциферазы внутри клеток использовали субстратную смесь на основе люциферина с pH5.0. При этом значении pH субстрат быстро проникает внутрь клетки и инициирует свечение, а внеклеточная люцифераза инактивируется. Для определения люциферазы вне клеток использовали субстратную смесь на основе люциферина и АТР с pH7.8, а этих условиях внутриклеточная люцифераза недоступна. Для определения внеклеточного АТР использовали АТР-реагент на основе люциферазы светляков. Для измерения общего АТР клетки лизировали ДМСО и в полученном экстракте определяли АТР с помощью АТР-реагента. Биолюминесценцию регистрировали на люминометре Zulux Corp. (США) с использованием фильтра с пропусканием 1.25% для снижения светового потока, что позволило использовать варьировать концентрации клеточной суспензии в широком диапазоне.

Влияние гентамицина изучали при концентрациях от 0 до 1.6 мг/мл и концентрациях клеток от 20 до 500 млн кл/мл. Инкубировали реакционные смеси в среде LB при 37°C в аэрированных условиях, а также в условиях ограниченного поступления кислорода для получения кривых роста бактерий в течение 3 часов. Скорость накопления ATPout зависела от концентрации эффектора – в присутствии гентамицина уровень ATPout увеличился до 14 раз в зависимости от его концентрации, в то время как в контрольном эксперименте ATPout вырос в 3 раза. Уровень внеклеточной люциферазы также превышал в 6-8 раз ее уровень в контрольном образце. ATPin в отсутствие антибиотика вырос в 2.5 раза, в то время как в присутствии гентамицина разных концентраций ATPin увеличился в 1.3 - 2 раза. При этом уровень внутриклеточного фермента увеличился в 3.5 раза в контроле, в то время как в гентамицине его уровень практически не менялся – можно предположить, что синтез эндогенной люциферазы клеткой *E. coli* прекратился. Таким образом, остаточное содержание ATPin в клетках свидетельствует о том, что на начальном этапе действия антибиотика проявляется, скорее, бактериостатический эффект.

Полученные результаты могут использованы при разработке новых модифицированных форм антибактериальных агентов при изучении эффективности и механизма их действия.

Работа выполнена в рамках госрегистрационной темы МГУ имени М.В. Ломоносова Номер ЦИТИС 121041500039-8/

ИМПУЛЬСНАЯ ХРОНОАМПЕРОМЕТРИЯ: НА ПУТИ К ОПЕРАЦИОННО СТАБИЛЬНЫМИ И УЛЬТРАЧУВСТВИТЕЛЬНЫМ БИОСЕНСОРАМ НА ОСНОВЕ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ

Касимовская В.С., Елисеев А.А., Карякин А.А., Комкова М.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1
E-mail: valeria.kasimovskaya@gmail.com

Неинвазивный мониторинг метаболитов в поте позволяет отказаться от анализа крови и проводить измерения in situ. Наиболее часто для этой цели применяются (био)сенсоры на основе берлинской лазури (БЛ), поскольку они не отравляются компонентами пота и имеют широкий диапазон определяемых концентраций. Традиционно в качестве отклика таких (био)сенсорных систем рассматривают изменение стационарного тока, пропорциональное концентрации метаболита. Однако их применение для мониторинга в биологических жидкостях ограничено. С одной стороны, низкие содержания метаболитов диктуют необходимость в применении высокочувствительных датчиков, которые обеспечивали бы высокие показатели «сигнал/фон». С другой стороны, длительный мониторинг предполагает высокую операционную стабильность (био)сенсоров, которая может снижаться в ходе стационарного измерения за счет гидролиза БЛ гидроксид-анионами, генерируемыми в ходе реакции.

Метод импульсной хроноамперометрии адаптирован для высокочувствительного и высокостабильного мониторинга метаболитов[1]. Режим основан на попеременном коротком замыкании и размыкании рабочего электрода на основе БЛ и хлоридсеребряного электрода сравнения с помощью программируемого амперметра. Исследована чувствительность (био)сенсоров в зависимости от межимпульсного интервала и времени регистрации сигнала. Установлено, что даже несмотря на высокие фоновые сигналы заряжения БЛ в импульсном режиме, возможно увеличить чувствительность сенсоров в 15 раз и соотношение «сигнал/фон» в 2 раза по сравнению с характеристиками в традиционном режиме. Это достигается за счет обогащения диффузионного слоя анализируемым веществом при размыкании цепи. Для лактатных биосенсоров этот эффект даже более драматичен за счет генерации пероксида водорода в ходе ферментативной реакции в интервале размыкания цепи. Так, при оптимальных условиях регистрации сигнала ($t_{размык}$=15 с, $t_{счит}$=800 мс) возможно на два порядка увеличить коэффициент чувствительности и на порядок соотношение «сигнал/фон».

Уменьшение времени замыкания цепи и закономерное снижение образующихся в ходе каталитической реакции гидроксид-анионов, а также их эффективный отвод с поверхности сенсора при размыкании цепи позволяют драматически улучшить операционную стабильность. Тогда как при регистрации стационарного тока сенсор полуинактивируется в 100 мкМ пероксида водорода в течение 50 мин, сенсоры в импульсном режиме ($t_{разм}$=30 с, $t_{счит}$=20 мс) сохраняют 100% первоначального отклика более 4 ч.

Литература:
Komkova M.A., Eliseev A. A., Kasimovskaya V. S., Poyarkov A. A., Eliseev A. A. and Karyakin A. A. *Anal. Chem.,* 2023, 95(19), 7528-7535

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, грант #21-73-10123.

РАЗРАБОТКА ТВЕРДОФАЗНОГО ФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА НА ОСНОВЕ АПТАМЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИОНОВ СУРЬМЫ

Комова Н.С., Серебренникова К.В., Берлина А.Н., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Ленинский проспект, 33, Москва, 119071, Россия,
e-mail: nad4883@yandex.ru

В настоящее время разработка высокоселективных и чувствительных методов определения катионов тяжелых металлов и металлоидов привлекает большое внимание вследствие серьезного загрязнения окружающей среды. Так, нормируемый в РФ предел допустимого содержания сурьмы в питьевой воде составляет 50 нг/мл, а ее избыточное поступление в организм человека оказывает негативное воздействие на здоровье [1]. Поэтому разработка простого метода для обнаружения ионов сурьмы (III) в низких концентрациях являлась задачей данного исследования.

В работе использовались олигонуклеотидные рецепторные молекулы (аптамеры), аналитическая востребованность которых обусловлена простотой получения и низкой стоимостью [2]. Впервые предложено применение комплементарных аптамеров в твердофазном ферментном анализе ионов сурьмы. Комплекс комплементарных биотинилированных аптамеров 5′-biotin-TT-TTT-TTT-TT-3′ (поли-Т) и 5′-biotin-AA-AAA-AAA-AA-3′ (поли-А) иммобилизуют в лунках микропланшета, используя для этого высокоаффинное взаимодействие биотин–стрептавидин. Последующая инкубация со стрептавидином, меченным пероксидазой, приводит к его связыванию со свободным биотином в комплексе комплементарных аптамеров, обеспечивая высокую каталитическую активность в отношении субстрата 3,3’,5,5’-тетраметилбензидина. Однако в присутствии ионов сурьмы аптамер поли-А образует комплекс с металлом [3], и связи в иммобилизованном комплексе комплементарных аптамеров разрушаются. Промывание микропланшета удаляет комплексы ионы сурьмы – поли-А, и из-за уменьшения числа сайтов связывания меченного пероксидазой стрептавидина регистрируемая трансформация субстрата снижается. Описанный эффект позволяет выявлять ионы сурьмы с рабочим диапазоном от 0,09 до 2,3 мкг/мл и пределом обнаружения 0,04 мкг/мл.

Для обеспечения условий высокочувствительной детекции изучено влияние других катионов на аналитический сигнал. Установлено, что присутствие катионов серебра (10 мкг/мл) на этапе формирования комплекса аптамеров обеспечивает рост регистрируемой каталитической активности, позволяя определять ионы сурьмы в более низких концентрациях - от 8 до 135 нг/мл – с пределом обнаружения 3 нг/мл. При этом присутствие других катионов – свинца, ртути, кадмия, меди, цинка, мышьяка, никеля, кобальта, хрома, олова и молибдена – не влияет ни на формирование детектируемого комплекса и его каталитическую активность, ни на аналитические характеристики предложенной методики определения ионов сурьмы.

Литература

1. Коньшина Л.Г., Лежнин В.Л. Гигиена и санитария, *2014,* **3,** 5-10
2. Toh S.Y., Citartan M., Gopinath S.C.B., Tang T.-H. *Biosens. Bioelectr*ю, 2015, **64**, 392-403.
3. Berlina A.N., Komova N.S., Zherdev A.V., Gaur M.S., Dzantiev B.B. *Appl. Sci.*, 2019, **9**, article 4782.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект 22-23-00859.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ГИДРОЛИЗА N-АЦЕТИЛ-L-АСПАРТИЛ-L-ГЛУТАМАТА ГЛУТАМАТ КАРБОКСИПЕПТИДАЗОЙ II ЧЕЛОВЕКА

Кривицкая А.В.,[а] Хренова М.Г.,[а,б] Немухин А.В.[б]

[а]ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2
al_krivickaya@mail.ru
[б]МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, г. Москва, ул. Колмогорова, 1, стр.3.

Глутаматкарбоксипептидаза II (GCPII) является мембраносвязанным металлоферментом, который выполняет множество функций в организме, включая участие в метаболизме нейропептидов, глутамата, а также в регуляции клеточной пролиферации и иммунной функции. GCPII катализирует гидролиз нейротрансмиттера N-ацетил-L-аспартил-L-глутамат (NAAG) в N-ацетил-L-аспартат (NAA) и L-глутамат. В нормальных условиях активность GCPII низка, что позволяет NAAG функционировать в качестве интактного дипептида. Однако в условиях высокой синаптической активности усиливается высвобождение NAAG и его расщепление с помощью GCPII, что способствует высвобождению глутамата. Чрезмерное накопление глутамата вызывает повреждение и гибель нейронов, которые связаны с множеством неврологических нарушений. Из-за присутствия глутамата во многих процессах в организме трудно создать глутамат направленные препараты, которые не оказывали бы негативного влияния на другие необходимые функции и не вызывали бы нежелательных побочных эффектов. Решением данной проблемы является ингибирование GCPII, которое позволит нацелиться на разработку специфических лекарственных средств. При поиске эффективной молекулы ингибитора исследователи часто отталкиваются от знаний о молекулярном механизме реакции фермента.

В данной работе установлен молекулярный механизм реакции гидролиза NAAG под действием GCPII методом молекулярного моделирования. Рассчитаны профили свободной энергии Гиббса всех элементарных стадий реакции. Представленный механизм включает в себя четыре элементарные стадии с энергетическими барьерами активации, не превышающими 7 ккал/моль. В качестве заключительной стадии реакции предлагается регенерация фермента, приводящая к понижению энергии системы на 6 ккал/моль. Также в работе рассмотрены две мутантные замены E424Q и Y552I GCPII из доступного списка точечных мутаций. Известно, что мутация E424Q снижает V_{max} в 8 раз, а мутация Y552I снижает k_{cat} в 80 раз. Для объяснения влияния мутаций на эффективность GCPII проведен анализ активации субстрата ферментом в фермент-субстратных комплексах электронно-плотностными дескрипторами. Для количественной оценки активации субстрата применены подходы на основе QTAIM и NBO-анализ динамических характеристик. Анализ двумерных карт лапласиана электронной плотности позволил идентифицировать структуры фермент-субстратных комплексов как реакционные и нереакционные. Объяснена роль точечных мутаций в ферменте, наблюдаемых в экспериментальных кинетических исследованиях: а именно, замена Y552I нарушает формирование оксианионного центра, а замена E424Q увеличивает расстояние нуклеофильной атаки. Обе мутации понижают активацию субстрата ферментом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 23-13-00011.

ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА С ЛИЗОЦИМОМ

Крюкова О.В., Глазкова Е.В., Климов Д.А., Левашов П.А., Кост О.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», 119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1, e-mail: so.b11onde@gmail.com

Ангиотензин превращающий фермент (АПФ) представляет собой цинк-зависимую пептидазу. АПФ учувствует во многих важных процессах в организме, таких как иммунный ответ, регуляция кровяного давления, репродукция и др, при этом свои основные физиологические функции АПФ выполняет, будучи закрепленным на клеточной мембране и при помощи специальной секретазы АПФ переходит в растворимое состояние, попадая во все жидкости организма, данный процесс называется шеддингом. Уровень АПФ в крови является маркером различных заболеваний, поэтому изучение причин, влияющих на шеддинг актуальны для изучения. Известно, что шеддинг может зависеть от множества факторов, таких, например, как связывание фермента на мембране с антителом, наличия мутаций [1], а также, как было показано в нашей лаборатории ранее стабилизация может происходить за счет образования комплекса с компонентами плазмы крови [2]. Исходя из результатов, была предложена возможная модель тройного комплекса АПФ, лизоцима человека и низкомолекулярного вещества – билирубина, но подтвердить ее удалось только косвенно, недавно удалось получить константу связывания АПФ быка с химически модифицированным лизоцимом человека.

В данной работе нами впервые были получены константы диссоциации комплексов АПФ очищенного из семенной жидкости и из лёгкого человека с лизоцимом человека и лизоцимом курицы. Было показано, что связывание АПФ человека с куриным лизоцимом в 2,5-3 раза выше, чем с человеческим лизоцимом. С помощью метода иммуносорбции было показано две области на поверхности АПФ– между доменами и на С-конце С-домена АПФ на которые действует лизоцим, изменяя доступность эпитопов 16 различных моноклональных антител, направленных на разные участки на поверхности обоих доменов АПФ. Кроме того, было вервые показано, что АПФ ингибирует мурамидазную активность лизоцима, что также свидетельствует об образовании комплекса этих двух ферментов, при этом лизоцим не оказывает никакого действия на активность АПФ.

Литература
Kramers C., Danilov S.M., *Circulation*, 2001, **104**, 1236-1240.
Danilov S.M., Luensdorf H., *Sci Rep.,* 2016, **6**, 34913.

ОДНОСТАДИЙНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ ИММУНОАНАЛИЗОМ

Кудрявцев А.Н., Башмакова Е.Е., Франк Л.А.

Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок 50/50, e-mail: kirush07@mail.ru

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является возбудителем одного из самых тяжелых нейродегенеративных заболеваний человека. Этот вирус передается иксодовыми клещами и широко распространен на евразийском континенте. ВКЭ передается из слюны инфицированного клеща в течение нескольких минут после его укуса, но в среднем только 5-10% клещей являются передающими ВКЭ-агентами.

Ранее нами была разработана и испытана тест-система для выявления ВКЭ в клещах твердофазным биолюминесцентным иммуноанализом в высокопроизводительном микропланшетном варианте. В качестве сенсора использовали гибридный белок14D5a-Rm7, состоящий из одноцепочечного мини-антитела к капсидному белку Е ВКЭ и модифицированной люциферазы *Renilla muelleri*. Испытания предложенной аналитической системы проводили в течение нескольких сезонов, были проанализированы более чем 1400 природных клещей. В качестве контроля образцы исследовали сертифицированными методами на основе либо ОТ-ПЦР, либо колориметрического иммуноанализа (Вектор-Бест). Чувствительность и специфичность биолюминесцентного анализа составили соответственно 93,1% и 98,9%.

Предложен в двух вариантах однофазный одностадийный биолюминесцентный анализ, основанный на явлении комплементации расщепленных фрагментов искусственной целентеразин-зависимой люциферазы NanoLuc с восстановлением биолюминесцентной активности при связывании с анализируемым вирусом. В сэндвич-варианте анализа происходит образование специфического иммунокомплекса на поверхности вирусной частицы с восстановлением биолюминесценции NanoLuc; в конкурентном варианте наличие вируса препятствует возникновению биолюминесцирующего комплекса.

Получен комплект гибридных белков, включающих одноцепочечное миниантитело против ВКЭ, либо домен D3 белка Е [1] и расщепленные фрагменты люциферазы. Определены оптимальные составы аналитических смесей и дизайн анализа. Проведены испытания предложенного варианта анализа, где в качестве антигена использовали вакцину с инактивированным вирусом ВКЭ («Клещ-Э-Вак», «ПИПВЭ им. М.П.Чумакова»), а также образцы клещей.

Литература

1. Байков И.К., Емельянова Л.А., Соколова Л.М., Карелина Е.М., Матвеев А.Л., Бабкин И.В., Хлусевич Я.А., Подгорный В.Ф., Тикунова Н.В. Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела ch14D5a против гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018, 22(4), 459-467.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности, КЗ 2023031309571.

МЕДЬ-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК CopC ОБЕСПЕЧИВАЕТ ВСТРАИВАНИЕ ИОНОВ МЕДИ В АКТИВНЫЙ ЦЕНТР ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗ

Куликова О.Г., Варфоломеева Л.А., Дергоусова Н.И., Тихонова Т.В., Попов В.О.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук,
119071, Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2
e-mail: kulikovaolgag@mail.ru

Медь-связывающие белки, одной из важнейших функций которых является регулирование внутриклеточной меди, представляют целый класс жизненно-важных для клетки белков [1]. Среди них можно выделить белки-шапероны семейства CopC, обнаруженные у различных бактерий [2,3]. Предполагается, что одной из функций белков CopC является перенос и встраивание ионов меди в активные центры медь-содержащих оксидоредуктаз.

Объектом настоящего исследования является периплазматический медь-связывающий белок CopC, выделенный нами из галоалкалофильной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus*. CopC из *Tv. paradoxus* имеет один сайт связывания ионов Cu2+ с константой диссоциации 1,5±0,17 μM, что значительно выше, чем константы диссоциации медных комплексов ранее описанных CopC (Kd 10-12 – 10-15 M). Как следует из пространственной структуры CopC, полученной с разрешением 2,5 Å, ион меди в CopC из *Tv. paradoxus* координирован также как в других CopC N-терминальной аминогруппой, His1 Nδ, Asp110 Oδ и His112 Nδ [4]. В геноме бактерии *Tv. paradoxus* гены белков CopCD располагаются рядом с генами медь-содержащего фермента - тиоцианатдегидрогеназы (TcDH). Механизм встраивания ионов меди в активный центр TcDH не установлен. Мы предположили, что именно CopC отвечает за встраивание ионов меди в активный центр TcDH. Для проверки этого предположения методами флуориметрического титрования и изотермической калориметрии показано, что CopC, содержащий ион меди, способен образовывать комплекс с неактивной безмедной формой TcDH. Константа диссоциации комплекса составила (1,0±0,1) μM. Образование комплекса сопровождается переносом ионов меди от молекулы CopC-Cu в активный центр TcDH, что подтверждается данными металлоанализа после разделения компонентов комплекса и возросшей ферментативной активностью TcDH.

Таким образом, медь-связывающий белок CopC можно рассматривать как шаперон, отвечающий за встраивание ионов меди в активный центр TcDH, приводящее к образованию каталитически активной формы фермента.

Литература
O'Halloran T.V., Culotta V.C. *Journal of Biological Chemistry.* 2000, **275**, 25057–25060.
Zhang X.X., Rainey P.B. *Environmental Microbiology*. 2008, **10**, 3284−3294.
Ekici S., Turkarslan S., Pawlik G., Dancis A., Baliga N.S., Koch H.G., Daldal, Mbio **5(1)**, 2009, e01055-13.
Osipov E.M., Lilina A.V., Tsallagov S.I., Safonova T.N., Sorokin D.Y., Tikhonova T.V., Popov V.O. *Acta Crystallographica*. 2018, **D74**, 632-642.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, грант № 23-74-30004.

ВАРИАНТЫ ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛХИЦИНА

Лопатко Н.Ю.,[а] Перескокова Е.В.,[а] Бейлинсон Р.М.,[а] Медянцева Э.П.,[а] Еремин С.А.[б]

[а]Казанский (Приволжский)Федеральный Университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18,
e-mail: nlopatko82@gmail.com
[б]Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1

Колхицин является лекарственным средством, давно применяющимся в медицинской практике для лечения различных заболеваний. Соединение представляет собой растительный алкалоид, источником которого служит растение безвременник осенний. Опасность применения колхицина заключается в широком спектре побочных действий, некоторые из них опасны для человека и могут привести к летальному исходу. Поэтому мониторинг этого вещества в окружающей среде и организме человека является актуальной задачей.

Одним из современных методов анализа лекарственных препаратов является иммуноанализ, обеспечивающий высокую селективность и чувствительность. И в этом плане применение иммуносенсоров для мониторинга лекарственных препаратов имеет определенные перспективы. Амперометрические иммуноферментные сенсоры (ИФС), основанные на сочетании иммунологической, ферментативной и электрохимической реакциях позволяют работать в широком концентрационном диапазоне, достичь низких нижних границ определяемых концентраций.

При разработке ИФС в качестве метки использовали фермент тирозиназу, а в качестве субстрата тирозиназы – фенол.

Варьирование разведения антител (1:1, 1:10, 1:100) показало, что наиболее широкий диапазон определяемых концентраций и лучшие аналитические характеристики разрабатываемых сенсоров наблюдаются при разведении 1:10. Установлено, что при соиммобилизации Ат и тирозиназы в присутствии колхицина наблюдается увеличение значения аналитического сигнала (активация) в концентрационном диапазоне 10^{-11}-10^{-6} М $c_с$ $c_н$ = 5×10^{-12}М. Значение константы связывания иммунных комплексов порядка $n\times10^{-9}$ $М^{-1}$ указывает на достаточно прочную связь между колхицином и моноклональными антителами против него в условиях эксперимента. Максимальный процент активации составил 53,8%, R^2=0,9655.

Поверхность разработанных иммуносенсоров была модифицирована восстановленным оксидом графена (ВОГ) и многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ). Это позволило улучшить некоторые аналитические характеристики сенсоров, в частности, чувствительность, коэффициент корреляции (R^2=0,9995) и максимальный процент активации (73,4%) – для ВОГ и R^2= 0,9701, 61,2% - для МУНТ. При этом диапазон определяемых концентраций не изменился - 10^{-11}-10^{-6} М. ($c_н$=7×10^{-12}М - ВОГ, $c_н$=6×10^{-12}М - МУНТ).

Для определения колхицина поляризационным флуоресцентным иммуноанализом в качестве трейсера использовали производное колхицин-этилендиаминфлуоресцеинизотиоцианат. Рабочие разведения трейсера (1:200) и антител (1:10). Разработанный конкурентный способ позволил определять колхицин в линейном диапазоне концентраций 1×10^{-11} - 1×10^{-5} М с $c_н$= 7×10^{-12} М и R^2=0,9938.

Разработанные иммуносенсоры были апробированы в определении следовых количеств колхицина в урине.

АГЛОМЕРАТЫ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ СТРЕПТАВИДИН-БИОТИН ДЛЯ ЛАТЕРАЛЬНОГО ПРОТОЧНОГО ИММУНОАНАЛИЗА

Лыпенко И.Д., Самсонова Ж.В., Осипов А.П., Саушкин Н.Ю.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские Горы, д. 1 стр. 11Б
e-mail: ilya.lypenko@gmail.com

Латеральный проточный иммуноанализ (ЛПИА) с визуальной детекцией, как правило, обладает меньшей чувствительностью, по сравнению с другими иммунохимическими методами анализа. Одним из подходов к повышению чувствительности ЛПИА является увеличение числа связавшихся в аналитической зоне тест-полоски меток за счет их предварительной модификации. В таком случае при использовании реагентов в тех же концентрациях, что и при стандартном варианте анализа, происходит увеличение интенсивности видимого сигнала в аналитической зоне, где происходит специфическое взаимодействие реагентов. Реализация данного подхода возможна при использовании системы стрептавидин-биотин, где указанные молекулы вводят в состав разных реагентов.

Наночастицы золота (НЧЗ) различного размера (10-30 нм), полученные в реакции восстановления золотохлористоводородной кислоты аскорбиновой кислотой, использовали для получения конъюгатов с небиотинилированными и биотинилированными антителами (Ат и бАт). Насыщающий уровень способных к связыванию остатков биотина достигался при 15–20-ти кратном мольном избытке биотина к белку (Ат). Процесс образования агломератов конъюгатов бАт-НЧЗ с участием свободного стрептавидина (Ствд) в растворе исследовали в диапазоне мольных соотношений С(Ствд):С(НЧЗ) от 0:1 до 3200:1. Методом динамического светорассеяния показано, что в присутствии 19–75-ти кратного избытка свободного стрептавидина в растворе конъюгаты бАт-НЧЗ образуют агломераты размером в 1,5-3 раза больше исходного конъюгата. Изучено взаимодействие конъюгатов бАт-НЧЗ в присутствии свободного стрептавидина с сорбированными на мембране стрептавидином или биотином. Показано изменение интенсивности окрашивания реакционных зон мембраны за счет снижения взаимодействия конъюгатов с сорбированным стрептавидином и усиления взаимодействия с сорбированным биотином при соотношениях стрептавидина к наночастицам золота, соответствующих области образования агломератов за счет изменения доступных к связыванию остатков биотина либо стрептавидина в составе агломератов. Агломераты наночастиц золота с использованием стрептавидина в качестве линкера за счет одновременного взаимодействия с остатками биотина в составе различных бАт-НЧЗ могут быть использованы в ЛПИА в качестве детектирующего реагента.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект №22-74-00018.

МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТНОГО СОСТАВА БУФЕРА ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ПРОТОКОЛА ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ *TARAXACUM KOK-SAGHYZ*

Мартиросян Л.Ю.[1,2], **Мартиросян Ю.Ц.**[1,2]

[1] *ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Россия, г. Москва, ул. Косыгина, 4*
[2] *ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, 127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42*
Levon-agro@mail.ru

Кок-сагыз является одним из перспективных каучуконосов, который можно выращивать на территории РФ. Для промышленного применения необходимо улучшить генетические характеристики и увеличить продуктивность данной культуры. Удобной платформой для проведения биотехнологических манипуляций на клеточном уровне являются протопласты. Жизнеспособные протопласты получают, в основном, в результате обработки клеток ферментами, разрушающими клеточную оболочку; её отсутствие облегчает проникновение в протопласт макромолекул (белки, нуклеиновые кислоты) и частиц (клеточные органеллы, микроорганизмы) из окружающего раствора. Технология получения протопластов, отработанная для ряда культурных растений, актуальна и для получения протопластов из растений кок-сагыза. Оптимальные условия для выделения протопластов индивидуальны для различных растений и типов тканей. Главными факторами являются состав ферментов, pH среды, выбор осмотического раствора, физиологическое состояние, возраст и условия выращивания исходного растения. Вероятность получения жизнеспособных протопластов увеличивается, если клетки находятся в состоянии активного роста.

Целью работы была разработка протокола для выделения протопластов из суспензионной культуры клеток данного каучуконоса. Протокол, с некоторыми модификациями, позволяет быстро изолировать протопласты не только из суспензионной культуры кок-сагыза, но и из листовых пластинок, корневых и каллусных тканей, с целью дальнейшей трансформации их плазмидной ДНК или для слияния протопластов.

В нашей работе мы модифицировали и оптимизировали для кок-сагыза протокол получения протопластов из одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale*). Одним из элементов оптимизации явились подбор и применение целлюлозолитических ферментов отечественного производства. Применяли ферментативный препарат, жидкий концентрат (продуцент - *Trichoderma reesei*), любезно предоставленный А. П. Синицыным (кафедра энзимологии, МГУ). Результаты показали высокую активность ферментов, что позволило получить большое количество жизнеспособных протопластов кок-сагыза. Разработанный нами протокол позволит, в дальнейшем, проводить генетическую модификацию, а также получение соматических гибридов с другими видами Taraxacum. Есть возможность одновременного оздоровления культуры от различных фитопатогенов, бактериального и вирусного происхождения.

СОЗДАНИЕ FRET-СЕНСОРОВ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК-ХРОМОПРОТЕИН ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АКТИВНОСТИ КАСПАЗЫ 3 *IN VITRO* И *IN VIVO*

Марынич Н.К.,[а] Грановский И.Э.,[а,б] Савицкий А.П.[а,в]

[а] Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071, Москва, Ленинский проспект 33 ст. 2, e-mail: marynich_n@mail.ru

[б] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов» им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Пущино, проспект Науки, д.5

[в] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, ул. Колмогорова, 1 ст. 11Б

FRET-сенсоры на основе флуоресцентных белков применяются для детекции активности каспазы-3 и определения ранней стадии эффекторной фазы. Сенсоры, в которых в качестве донора выступает красный флуоресцентный белок, позволяют работать в области с наименьшим поглощением и автофлуоресценцией клеток млекопитающих, а использование хромобелков в качестве акцептора нивелирует фоновую флуоресценцию [1]. Целью настоящей работы являлась разработка сенсора для определения активности каспазы *in vivo.*

В первую очередь подобран нефлуоресцирующий акцептор−хромопротеин. Потенциальными кандидатами являлись четыре хромопротеина: gfasCP, spisCP, anm2CP и Ultramarine, имеющие высокие интегралы перекрывания с красной формой SAASoti Методами гель-фильтрации (ГФ) и динамического светорассеяния (ДСР) показано, что среди всех хромопротеинов только Ultramarine является мономером. Получен сенсор TagRFP-23-Ultramarine (TR-23-U). Методами ГФ и ДСР подтверждено мономерное состояние сенсора. После инкубации с каспазой-3 интенсивность флуоресценции TagRFP возросла более чем в 2 раза, а соотношение времен жизни флуоресценции свободного и связанного TagRFP изменилось в 5,8 раз в сторону свободного TagRFP, что свидетельствовало об эффективном гидролизе сенсора каспазой-3 и нарушении FRET между белками.

Применение нового сенсора планировалось в методе флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС), который позволяет анализировать олигомерное состояние белков и, соответственно, регистрировать расщепление FRET-сенсора, однако он эффективен только на концентрациях белка порядка 10^{-8}–10^{-9} М. Для контроля концентрации в качестве флуоресцентного донора выбран бифотохромный белок moxSAASoti [2]. Для нового варианта moxSAASoti характерна высокая скорость фотоконверсии, но низкая фотостабильность красной формы, поэтому необходима оптимизация донора. Путем введения замены F97M был получен новый вариант с более стабильной и яркой красной формой. Также для более эффективного созревания в клетках млекопитающих введена замена H74K. На основе новой формы moxSAASoti был создан сенсор moxSAASoti-23-Ultramarine.

Литература

1. Savitsky A. P. *et al.* FLIM-FRET imaging of caspase-3 activity in live cells using pair of red fluorescent proteins. *Theranostics,* 2012, **2**, 215–226.

2. Marynich N. K. et al. First biphotochromic fluorescent protein moxSAASoti stabilized for oxidizing environment. *Scientific Reports.* 2022, **12**,7862,

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОТОПНОМЕЧЕННЫХ SAH И SAM В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Марьясина С.С.[а,б,в], **Руденко А.Ю.**[а,б], **Польшаков В.И.**[б]

[а]МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет,
119991, Россия, Москва, Ленинские горы, 1с3
e-mail: sofia.mariasina@yandex.ru
[б]МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет Фундаментальной медицины,
119192, Россия, Москва, Ломоносовский пр-т, 27к1
[в]МГУ имени М.В. Ломоносова, Институт функциональной геномики,
119204, Россия, Москва, Ленинские горы, 1с40

Природные вещества, содержащие редкие изотопы, необходимы для решения многих задач. Так, в ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии широко применяются соединения, содержащие стабильные изотопы ^{13}C, ^{15}N, ^{2}D и ^{17}O. Также существует ряд методов, основанных на включении в биомолекулы радиоактивных изотопов: ^{14}C, ^{3}H и ^{18}O.

Обычно для получения изотопномеченных соединений приходится разрабатывать многостадийные синтетические схемы. Это осложняет производство и затрудняет их доступность для исследователей. С другой стороны, многие биомолекулы можно получить из бактерий, эукариотических клеток или растительного материала. Выращивание природных объектов на средах, содержащих необходимые изотопы, позволяет получать целевые соединения, имеющие заданный изотопный состав.

S-аденозил-L-метионин (SAM) — второй (после АТФ) по распространённости белковый кофактор. Он участвует в огромном количестве биологических процессов, включая реакции метилирования. S-аденозил-L-гомоцистеин (SAH) — побочный продукт биометилирования, образующийся в результате переноса CH3-группы с SAM на субстрат.

В настоящей работе мы предложили новый способ получения SAM и SAH, меченных изотопами. В его основе лежит выращивание клеток *Escherichia Coli*, экспрессирующих рекомбинантный белок WBSCR27 из *Mus Musculus*, на изотопно-обогащённой среде. Высокий уровень экспрессии этого белка и его необычайная стабильность[1], а также способность WBSCR27 образовывать прочный комплекс с кофактором[2] позволили нарабатывать изотопномеченный SAM в бактериях и выделять его в чистом виде. В свою очередь, способность белка WBSCR27 катализировать превращение SAM в SAH[2] позволила получать этим методом не только SAM, но и SAH.

Предложенный нами протокол не предусматривает проведения синтетических процедур, а также исключает необходимость использования дорогостоящего оборудования для разделения сложных смесей, такого как ВЭЖХ-хроматограф. Этот метод легко реализовать в любой лаборатории, оборудованной для выращивания бактерий и выделения белков.

Разработанный протокол апробирован нами на получении ^{13}C,^{15}N-меченного SAH, который был далее использован для определения структуры белка WBSCR27 в растворе методом спектроскопии ЯМР[3]. Этот протокол можно легко адаптировать для получения SAM и SAH с любыми изотопами C, H, O и N, которые необходимы для различных задач[4].

Литература
1. Mariasina S. S. et al. *Biomolecular NMR Assignments*, 2018, **12**.
2. Mariasina S. S. et al. *The FEBS journal,* 2020, **287**, 24.
3. Mariasina S. S. et al. *Frontiers in Molecular Biosciences,* 2022, **9**.
4. Rudenko A. Y., Mariasina S.S., Polshakov V.I. *Molecular Biology,* 2022, **56,** 2

Работа выполняется при финансовой поддержке РНФ, проект 19-14-00115.

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ У *MUSCA DOMESTICA L.*

Маслакова К.Ю., Кинарейкина А.Г., Янгирова Л.Я.

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной энтомологии и арахнологии – филиал ТюмНЦ СО РАН, 625041, Тюмень, Институтская 2,
e-mail: k.y.maslakova@gmail.com

Глутатион-S-трансферазы (GSTs) (EC 2.5.1.18) представляют собой мультигенное семейство полифункциональных ферментов, катализирующих конъюгацию восстановленного глутатиона (GSH) с широким спектром электрофильных соединений. У беспозвоночных известно изменение активности GST в зависимости от возраста [1].

Цель работы состояла в исследовании изменений активности глутатион-S-трансферазы на разных стадиях развития у *Musca domestica* L. Активность GST определяли как описано в работе [2] с небольшими изменениями. Результаты, полученные в ходе работы, представлены в таблице 1.

Таблица **1.** Активность GST *Musca domestica* L. на разных стадиях развития (ΔOD/мин/мг белка ± ст. откл.)

Стадии развития	Яйца	Личинки (1 сут)	Личинки (6 сут)	Куколки	Имаго (1 сут)	Самки (5 сут)	Самцы (5 сут)
n	8	8	6	7	5	10	10
Среднее значение	3.4937± 0.2138cde	2.7571± 0.5132d	4.795± 0.6107b	4.070± 0.3900be	4.3451± 0.5724bc	4.6669± 0.5438b	5.7329± 0.6264a

Примечание: n – объём выборки; ΔOD – оптическая плотность; величины, отмеченные разными буквами, отличаются статистически значимо согласно критерию Тьюки ($p \leq 0,05$).

Обнаружено увеличение активности GST в 1.37 раз у личинок 6-ти дневного возраста относительно стадии яйца. Отмечено значительное увеличение активности у личинок 6-ти дней развития (в 1.74 раза), куколок (в 1.48 раз), суточных особей (в 1.58 раз) по сравнению с личинками 1-го дня развития. Отмечено увеличение активности фермента у самцов по сравнению с личинками 6-ти дневного возраста (в 1.19 раз), куколками (в 1.41 раз) и суточными имаго (в 1.30 раз), у самок подобных изменений не наблюдалось.

Таким образом, наиболее высокая активность GST наблюдалась у 5-ти дневных самцов, что может быть проявлением полового диморфизма у *M. Domestica* L. Papadopoulos A.I. с соавторами предположили, что увеличение активности GST у взрослых *Apis mellifera* может быть вызвано экспрессией отдельных изоформ фермента, что, возможно, связано с изменением кормовой базы взрослой особи [1], периодом размножения (уместно в отношении *M. domestica* L.) и/или другими факторами.

Литература
1. Papadopoulos A.I. et al. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2004, **139(1-3)**, 87-92.
2. Serebrov V.V. et al. *Biology Bulletin*, 2006, **33(6)**, 581-586.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках проекта №122122800052-9.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ХИТОЗАНОМ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

Матвеева В.Г.[а], Тихонов Б.Б.[а], ЛисичкинД.Р.[а], СтадольниковаП.Ю.[а], СульманМ.Г.[а], DesaiA.Sh.[б]

[а] Тверской государственный технический университет, 170026, Тверь, наб. Афанасия Никитина, 22
e-mail: matveeva@science.tver.ru
[б] Dr. BalasahebSawantKonkanKrishiVidyapeeth, 415712, Индия, штат Махараштра, Даполи

Глюкозооксидаза (К.Ф. 1.1.3.4)– димерныйфлавопротеин класса оксидоредуктаз, катализирубщийокисление β-D-глюкозы до D-глюконо-δ-лактона и пероксида водорода сиспользованием молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов, который широко применяется в различных процессах химической технологии и аналитической химии. Однако не всегда использование растворимой формы фермента позволяет достичь требуемой эффективности процесса. Иммобилизация глюкозооксидазы на твердых носителях увеличивает устойчивость фермента к ингибирующим факторам, закрепляет его конформацию, а также дает возможность многократно использовать, легко отделяя его от реакционной среды.

Был синтезирован биокатализатор на основе глюкозооксидазы и магнитных наночастицF3O4, модифицированных хитозаном. Втермостатируемом реакторе, оборудованном обратным холодильником, смешивали по 15 мл водных растворов $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,4 моль/л) и $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (0,2 моль/л). Смесь перемешивали в течение 15 минут со скоростью 400 $мин^{-1}$, нагревали до 65 ºС, после чего вносили в нее по каплям со скоростью 2 мл/мин 10 мл раствора аммиака. Далее к смеси добавляли 50 мл раствора хитозана (0,05÷0,5 г в 50 мл 0,2 М уксусной кислоты) и выдерживали при постоянном перемешивании 30 минут. После окончания синтеза наночастицы отделяли с помощью магнита и многократно промывали дистиллированной воды для удаления неспецифически связанных реагентов.

Иммобилизация глюкозооксидазы на поверхности модифицированных хитозаном магнитных наночастиц проводилась 2 способами:

1) С использованием глутаровогодиальдегида(GA). 0,1 г модифицированных наночастиц смешивали с 10 мл 25 %-ного раствора GA, выдерживали 6 часов при постоянном перемешивании, промывали дистиллированной водой, отделяли с помощью магнита, после чего выдерживали частицы в 10 мл раствора глюкозооксидазы из *Aspergillusniger* (10 мг) в фосфатном буферном растворе (pH = 6,0) в течение 1 часа при постоянном перемешивании, промывали дистиллированной водой, отделяли с помощью магнита и высушивали на воздухе.

2) С использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорида(EDC). 10 мл раствора глюкозооксидазы из *Aspergillusniger* (10 мг) в фосфатном буферном растворе (pH = 6,0) в течение 1 часа при постоянном перемешивании смешивали с 20 мл раствора, содержащего 0,1 г EDCи 0,04 г N-гидроксисукцинимида. Далее в эту смесь помещали 0,1 г модифицированных, выдерживали 12 часов при постоянном перемешивании, промывали дистиллированной водой, отделяли с помощью магнита и высушивали на воздухе.

Синтезированные биокатализаторы имели следующие показатели активности в реакции окисления D-глюкозы (начальная концентрация – 2 ммоль/л): сохранение активности – 45,1 % (с GA), 58,4 % (с EDC); предельная скорость реакции (V_m) –0,93 ммоль/л·мин (с GA), 1,22 ммоль/л·мин (с EDC); константа Михаэлиса(K_M)- 5,24 ммоль/л (с GA), 2,39 ммоль/л (с EDC).

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (проект № 075-15-2022-1232).

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСАМИНАЗ С НЕТИПИЧНЫМ АМИНОКИСЛОТНЫМ СОСТАВОМ АКТИВНОГО ЦЕНТРА

Матюта И.О.,[1,2] Шилова С.А.,[1] Бакунова А.К.,[1] Николаева А.Ю.,[1,3] Безсуднова Е.Ю.,[1] Попов В.О.,[1] Бойко К.М.[1]

[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
119071, Москва, Ленинский проспект, 33с2
e-mail: i.matyuta@fbras.ru
[2]Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)
[3]Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

В последнее время в мире существует подогреваемый экологическими и экономическими стимулами устойчивый интерес к замене традиционных технологических химических цепочек на реакции, катализируемые ферментами-биокатализаторами. Одним из перспективных биологических объектов для целей практического применения являются трансаминазы (аминотрансферазы, ТА). Это обширный класс ферментов, представители которого катализируют обратимый стереоселективный перенос аминогруппы с аминосубстрата на кетон/кетокислоту/альдегид с получением хирального амина/аминокислоты и нового кетосоединения. Значительная часть прикладных исследований трансаминаз направлена на разработку биокатализаторов синтеза оптически чистых аминов и неприродных D- и L- аминокислот, кетокислот, а также на разработку каскадных ферментативных процессов, включающих стадию стереоселективного аминирования.

Для настройки целевого фермента под конкретные технологические задачи необходимо установить взаимосвязь между его характеристиками и структурными мотивами, определяющими эти характеристики. Установлено, что субстратная специфичность и эффективность катализа трансаминаз определяется свойствами аминокислотных остатков вокруг молекулы кофактора в активном центре. Для некоторых трансаминаз в активном центре выделяют характеристические аминокислотные мотивы, присутствие которых однозначно определяет специфичность фермента. В этой связи фундаментальный интерес представляют трансаминазы, активный центр которых не содержит характеристические мотивы.

В рамках настоящей работы с помощью рентгеноструктурного анализа был получен ряд структур бактериальных трансаминаз IV-го типа укладки пиридоксаль-5’-фосфат –связывающего домена, имеющих нетипичное строение активного центра, а также проведен их детальный сравнительный анализ с “классическими” трансаминазами.

Работа выполнена при поддержке Министерства Науки и Высшего Образования Российской Федерации - грант № 075-15-2021-1354.

S-НИТРОЗИЛИРОВАНИЕ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГ ИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ: ПРОДУКТЫ МОДИФИКАЦИИ И ВЛИЯНИЕ НА СВОЙСТВА ФЕРМЕНТА

Медведева М.В., Серебрякова М. В., Клейменов С.Ю., Муронец В.И., Шмальгаузен Е.В.

Факультет Биоинженерии и Биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы;
maria@fbb.msu.ru

Остатки цистеина в белках могут подвергаться S-нитрозилированию в присутствии окиси азота (NO) с образованием соответствующих S-нитрозотиолов (Protein-S-NO). S-нитрозилирование принимает участие в регуляции разнообразных клеточных процессов, включая апоптоз. Известно, что апоптоз сопровождается перемещением глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) из цитоплазмы в клеточное ядро [1]. Предполагается, что развитие апоптоза индуцируется S-нитрозилированием ГАФД, однако до сих пор непонятны молекулярные механизмы, которые вызывают перемещение ГАФД в ядро.

Целью данной работы была идентификация продуктов S-нитрозилирования ГАФД и изучение влияния данной модификации на стабильность и каталитические свойства ГАФД.

Было показано, что инкубация ГАФД с донором NO приводит к исчезновению дегидрогеназной активности ГАФД, что предполагает модификацию каталитического цистеина (Цис150). В то же время появляется ацилфосфатазная активность, которая характерна для цистеин-сульфеновой кислоты в активном центре ГАФД (ГАФД-S-OH).

Показано, что число модифицированных цистеинов при нитрозилировании составляет 3,3 на тетрамер ГАФД. При этом включение NO в молекулу ГАФД с образованием ГАФД-SNO составляет 2,3 моль/тетрамер ГАФД. Следовательно, содержание цистеин-сульфеновой кислоты не превышает 1 моль/тетрамер ГАФД.

Используя реагент на сульфеновую кислоту (димедон) методом MALDI-TOF масс-спектрометрии было показано, что S-нитрозилирование ГАФД сопровождается модификацией каталитического остатка Цис150 с образованием цистеин-сульфеновой кислоты (ГАФД-S-OH). Предположительно, цистеин-сульфеновая кислота образуется вследствие гидролиза нитрозилированной ГАФД (ГАФД-SNO) [2].

Проведено исследование S-нитрозилированной ГАФД в сравнении с нативным ферментом. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии показано, что нитрозилирование ГАФД снижает термостабильность фермента и уменьшает кооперативность разворачивания белка. Показано, что S-нитрозилирование повышает чувствительность ГАФД к расщеплению трипсином.

Инактивация ГАФД, наблюдаемая при нитрозилировании, легко обратима при нейтральных значениях pH в присутствии дитиотреитола, восстановленного глутатиона и глутаредоксина 1.

Заключение: S-нитрозилирование ГАФД приводит к частичному разворачиванию белковой глобулы, что может приводить к изменению взаимодействия ГАФД с белками-партнерами.

Литература
1. Hara M.R., Cascio M.B., Sawa A. Biochim. Biophys. Acta 2006, **1762**, 502.
2. Schmalhausen EV, Medvedeva MV, Serebryakova MV, Chagovets VV, Muronetz VI. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2022, **1866**, 130032.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 21-14-00037).

АНОМАЛЬНОЕ КИНЕТИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С БЕНЗОИЛХОЛИНОМ В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТА

Мухаметгалиева А.Р.,[а] Немтарев А.В.,[б] Сякаев В.В.,[б] Паширова Т.Н.,[б] Массон П.[а]

[а] Казанский Федеральный университет, лаборатория Биохимической Нейрофармакологии, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская 18,
email: aliya_rafikovna@mail.ru
[б] Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова, ФИЦ Казанский научный центр РАН, 420088, г. Казань, ул. Арбузова 8

Ацетилхолинэстераза (КФ 3.1.1.7) – является важным ферментом, гидролизуя нейромедиатор ацетилхолин, осуществляет передачу нервного импульса. Многие субстраты холинэстераз – положительно заряженные соединения, которые проявляют сложное кинетическое поведение из-за аллостерических эффектов (активации/ингибирования), связанных с конформационными изменениями в ферменте [1]. Бензоилхолин также является положительно заряженным субстратом ацетилхолинэстеразы. Однако полученные результаты стационарной кинетики показывают, что при концентрации более 600 мкМ наблюдается резкое падение активности фермента. Такое поведение не соответствует модели активации/ингибирования.

Для объяснения этого явления мы предложили и проверили две гипотезы.

1) При высоких концентрациях молекулы бензоилхолина образуют мультимеры, что затрудняет их проход к активному центру фермента. Первая гипотеза была опровергнута с помощью ряда физико-химических методов таких как ЯМР-спектроскопия, тензиометрия, динамическое светорассеяние, УФ-спектрофотометрия, солюбилизация судана I.

2) При высокой концентрации субстрата – продукты реакции (бензойная кислота и холин) либо не диссоциируются от активного центра, либо накапливаются в пространстве активного центра, препятствуя проникновению новых молекул субстрата. Вторая гипотеза была проверена с помощью стационарной кинетики при гидролизе бензоилхолина в присутствии продуктов реакции, а также при конкурирующей кинетике в двух- и трех-компонентной системе. Наиболее вероятным решением описанного процесса мы объясняем тем, что продукты гидролиза – бензойная кислота и холин остаются связанными с каталитическим активным сайтом, что приводит к непродуктивному тройному комплексу «субстрат-фермент-продукт» [2].

Данное кинетическое поведение субстрата может иметь физиологическое и фармакологическое значение, в частности, в случае гидролиза крупных субстратов, используемых в качестве лекарств или токсикантов.

Литература
1. Mukhametgalieva A.R., Lushchekina S.V., Aglyamova A.R., Masson P. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics, 2022,* **1870, 140733.**
2. Rosenberry T. L. *J. Mol. Neurosci*., 2010, **40**, 32 – 39.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета («ПРИОРИТЕТ – 2030»).

ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕГРАДАЦИИ ПУРИНОВ В КЛЕТКАХ *CORYNEBACTERIUM SPP*

Никитина О.В., Апаркина Д.Г., Кутукова Е.А., Ямпольская Т.А.

Акционерное общество «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика», 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1, к.1.
e-mail: Oxana_Nikitina@agri.ru

В настоящее время сложная схема взаимопревращений пуринов довольно хорошо изучена в клетках млекопитающих и некоторых бактерий, например *Escherichia coli* [1]. Для грамположительных бактерий, таких как *Bacillus subtilis* [2] и *Brevibacterium acetylicum (Exiguobacterium acetylicum)* [3] показано двухстадийное превращение пуриновых нуклеотидов в основания с помощью двух изоформ пуриннуклеозидфосфорилазы (PNP). Целью работы было изучение ферментативной деградации пуриновых нуклеотидов у бактерий рода *Corynebacterium*, которая к настоящему времени практически не изучена.

В работе использовали три штамма дикого типа: *C. glutamicum* 13032, *C. stationis* 17108 и *C. casei* 17111. Клетки разрушали ультразвуком, и лизаты использовали в качестве грубого экстракта. Была разработана схема частичной очистки ферментов, включающая: фракционное осаждение сульфатом аммония, обессоливание с использованием колонки PD10 и ионообменную хроматографию (DEAE FF HiTrap). Активность ферментов определяли путем разделения методом ТСХ и идентификации в УФ соединений, содержащих пуриновое кольцо. Пуриновые продукты реакции подтверждали и количественно определяли с помощью ВЭЖХ.

Мы протестировали активности в грубых экстрактах и частично очищенных белковых препаратах, используя нуклеотиды и нуклеозиды в качестве субстратов (аденозинмонофосфат, инозинмонофосфат, гуанозинмонофосфат, аденозин, инозин и гуанозин). В результате у всех трех штаммов *Corynebacterium* были обнаружены следующие ферментативные активности: фосфатазная или 5’-нуклеозидазная (EC 3.1.3.5), пуриннуклеозидфосфорилазная или пурин-нуклеозид:ортофосфат-рибозилтрансферазная (PNP, EC 2.4.2.1) и пуриннуклеотид 5’-монофосфатнуклеозидазная (PNMN, EC 3.2.2.10).

Таким образом, в клетках *Corynebacterium* существуют ферменты, обеспечивающие два различных пути деградации пуриновых нуклеотидов: первый путь протекает в одну стадию, образуя основание непосредственно из нуклеотида (PNMN); второй представляет собой двухстадийную трансформацию: нуклеотид – нуклеозид - пуриновое основание (5’-нуклеозидаза/ PNP). Мы надеемся, что дальнейшая оптимизация очистки позволит нам идентифицировать эти ферменты и подробно изучить их свойства.

Литература

1. Petersen C, Moller LB, Valentin-Hansen P. The cryptic adenine deaminase gene of *Escherichia coli*. Silencing by the nucleoid-associated DNA-binding protein, H-NS, and activation by insertion elements. *J Biol Chem*. 2002, **277** (35), 31373-31380.
2. Shirae H, Yokozeki K. Purification and properties of purine nucleoside phosphorylase from *Brevibacterium acetylicum* ATCC 954. *Agric Biol Chem*. 1991, **55** (2), 493-499.
3. Jensen KF. Two purine nucleoside phosphorylases in *Bacillus subtilis*. Purification and some properties of the adenosine-specific phosphorylase. *Biochim Biophys Acta*. 1978, **525** (2), 346-356.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА НОВОГО РАЦИОМЕТРИЧЕСКОГО КАЛЬЦИЕВОГО ИНДИКАТОРА FNCAMP НА ОСНОВЕ ЯРКОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА MNEONGREEN И КАЛЬМОДУЛИНА- M13 ПЕПТИДА ИЗ *ASPERGILLUS NIGER*

Николаева А.Ю.,[1] Субач О.М.,[2] Варфоломеева Л.А.,[1] Власкина А.В.,[2] Агапова Ю.К.,[2] Пяткевич К.Д.,[3,4] Бойко К.М.[1], Субач Ф.В.[2]

[1] ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
119071, Москва, Ленинский проспект, 33с2
e-mail: kmb@inbi.ras.ru
[2] НИЦ «Курчатовский институт», Москва
[3] Westlake Laboratory of Life Sciences and Biomedicine, КНР
[4] Institute of Basic Medical Sciences, КНР

Генетически кодируемые кальциевые индикаторы являются эффективным инструментом для визуализации кальций-зависимых процессов как в клеточных культурах, так и в нейрональных системах *in vivo.* К настоящему моменту наиболее разработанными кальциевыми индикаторами являются интенсиометрические сенсоры с положительным кальциевым ответом, для которых характерна быстрая динамика и высокая чувствительность к изменению концентрации ионов кальция. Однако их использование не позволяет количественно оценить концентрацию кальция в клетках, а также затрудняет визуализацию кальциевых процессов *in vivo* в связи трудностью локализации невозбужденных нейронов из-за крайне низкой интенсивности флуоресцентного сигнала при низких концентрациях кальция. Данные проблемы могут быть решены использованием рациометрических кальциевых индикаторов, в которых связывание со свободными ионами кальция приводит к сдвигу в интенсивности длин возбуждения и поглощения.

Ранее был разработан и охарактеризован рациометрический кальциевый индикатор FGCaMP7, была показана его применимость для визуализации нейронов гиппокампа и коры головного мозга мыши посредством двух-фотонного имеджинга. Несмотря на высокую чувствительность, данный сенсор обладал низкой контрастностью протонированной формы, а также неоптимальной топологией. Чтобы устранить эти недостатки, был разработан и охарактеризован новый рациометрический кальциевый индикатор FNCaMP на базе фьюжена кальмодулина с M13 пептидом из *A.niger* с ярким флуоресцентным белком mNeonGreen. Для исследования взаимосвязи между характеристиками индикатора и его структурой последняя была установлена нами с разрешением 2.4Å. Сравнительный структурный анализ позволил пролить свет на молекулярные основы флуоресцентной чувствительности сенсора к кальцию и механизм быстрого переключения белка между состояниями со связанным кальцием и без него. Полученные данные могут быть использованы для дальнейшей разработки и оптимизации рациометрических кальциевых индикаторов с заданными свойствами.

Работа поддержана грантом РНФ № 21-74-20135.

КЛЕТКИ *RHODOCOCCUS RHODOCHROUS* ПОВЫШАЮТ ОПЕРАЦИОННУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ СИНТЕЗА АКРИЛОВЫХ МОНОМЕРОВ

Новиков А.Д.,[а] Лавров К.В.,[а] Гречишникова Е.Г.,[а] Шемякина А.О.,[а] Калинина Т.И.,[а] Глинский С.А.,[б] Минасян Р.А.[б], Воронин С.П.,[б] Яненко А.С.[а]

[а]НИЦ "Курчатовский институт", Курчатовский Геномный центр, 117545, Москва, 1-Дорожный проезд,1
e-mail: yanenko@genetika.ru
[б]ЗАО "Биоамид", 410033, Саратовская обл, г. Саратов, ул. Международная, д. 27
e-mail: bioamid@yandex.ru

Акриловые мономеры – это сырьё для получения полимеров, широко используемых в разных отраслях экономики. Особенностью биокаталитических способов синтеза акриловых мономеров (синтез с помощью интактных клеток бактерий) является агрессивность компонентов реакционных смесей для клеток и ферментов, и постепенная инактивация фермента в ходе синтеза. Время жизни ферментов может зависеть, в том числе, от строения клеток БК, и микроокружения фермента в клетке.

С целью выяснения влияния клеток на операционную стабильность БК, сконструированы штаммы *Rhodococcus rhodochrous*, экспрессирующие ген нитрилазы из *Alcaligenes denitrificans* C-32 (для получения акриловой кислоты), и ген ациламидазы из *R. qingshengii* TA37 (для получения функционализированных акриламидов, в т.ч. N-изопропилакриламида). Для сравнения с этими штаммами, использовали штамм *A. denitrificans* C-32, экспрессирующий нитрилазу, и штамм *E. coli*, экспрессирующий ациламидазу. Проведено сравнение динамики синтеза продуктов и инактивации соответствующих активностей клеток в ходе синтезов, моделирующих условия промышленных процессов.

Динамика синтезов акриловой кислоты была изучена при двух скоростях подачи акрилонитрила, различающихся в полтора раза, и одинаковом количестве единиц активности БК. При пониженной скорости динамика синтеза у двух штаммов не отличалась, и в обоих вариантах накапливалось около 180 г/л продукта за 5 ч. При повышенной скорости БК *R. rhodochrous* накапливал около 245 г/л продукта, а БК *A. denitrificans* прекращал синтез после 1-го часа процесса, накапливая не более 40 г/л продукта. Сходным образом, но при варьировании скорости подачи двух компонентов, акриламида и изопропиламина изучался синтез N-изопропилакриламида. При повышенной скорости подачи БК на основе *E. coli* полностью инактивировался после получаса синтеза, и накапливал не более 5 г/л продукта, в то время как БК *R. rhodochrous* инактиваировался на 50% после 6 ч процесса, и накапливал около 30 г/л продукта.

Таким образом, обнаружено, что, при сравнимых удельных активностях клеток, и одинаковых условиях синтезов, БК на основе *R. rhodochrous* сохраняют активность существенно дольше, чем БК на основе клеток *A. denitrificans* и *E. coli.* Полученные данные создают основу для разработки и усовершенствования новых БК для получения акриловых мономеров, и открывают новые направления изучения биологии бактерий *Rhodococcus.*

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного Задания НИЦ «Курчатовский институт» (номер АААА-А20-120093090015-2 от 30.09.2020).

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕАКЦИЙ СВЯЗЫВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА ФЛАВИНОМ В МОНООКСИГЕНАЗЕ EncM

Одинцов К.В., Домрачева Т.М., Григоренко Б.Л.

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119234, Москва, ул. Колмогорова, 1, стр.3
e-mail: konstantin.odintsov@chemistry.msu.ru

ФАД-зависимая монооксигеназа EncM, выделенная из бактерии *Streptomyces maritimus*, катализирует окисление метиленовой группы субстрата до кето-группы на пути синтеза антибиотика энтероцина, используя в качестве источника атомов О кислород воздуха [1]. Проблема установления механизма работы EncM привлекает значительное внимание исследователей, поскольку этот фермент стал первым примером, за несколько десятилетий исследований флавиновых монооксигеназ, формирования атипичного аддукта присоединения O_2 к восстановленному флавину – N_5-оксида флавина.

Основным аргументом, подтверждающим образование N_5-оксида флавина в EncM, стали спектры поглощения фермента, полученные при его смешивании с раствором O_2 в экспериментах по спектрофотометрии остановленного потока, которые продемонстрировали качественные отличия от спектра C_{4a}-(гидро)пероксида флавина, считавшегося до недавнего времени единственно возможным аддуктом присоединения кислорода к флавиновому кольцу [2]. Несмотря на то, что в экспериментах не удалось зафиксировать никаких интермедиатов, был выдвинут гипотетический механизм образования аномального аддукта [2], который до настоящего времени не имеет строгого экспериментального или теоретического подтверждения. В связи с этим нами предпринята попытка моделирования механизмов взаимодействия O_2 с ФАД в EncM по следующей методологии.

На первом этапе осуществляется комбинированная КМ/ММ динамика основных интермедиатов и аддуктов присоединения кислорода, которая позволяет выявить ключевые взаимодействия с активным центром фермента. Второй этап заключается в построении кластерной модели активного центра на основе результатов КМ/ММ динамики, оптимизации в ней геометрий стационарных точек по ТФП (UPBE0-D3/6-31G*), сравнении их энергий и расчете спектров поглощения методом МКССП/МКТВ (CASSCF/XMCQDPT2/cc-pVDZ).

В рамках комбинированной КМ/ММ динамики идентифицированы водородные связи с участием остатков GLU134, VAL135, VAL136, THR139, TYR416, а также 2’-OH рибитильной цепи ФАД, участвующие в стабилизации интермедиатов и аддуктов. Кроме того, подтверждена устойчивость ковалентной связи ФАД – HIS78, обсуждаемая в литературе, и выявлена роль TYR416 как модулятора барьеров присоединения O_2 по положениям C4a и N5. Наконец, рассчитаны спектры поглощения ключевых структур, которые могут помочь в идентификации интермедиатов в эксперименте.

Литература
1. Teufel, R. et al. Flavin-mediated dual oxidation controls an enzymatic Favorskii-type rearrangement. Nature 503, 552–556 (2013).
2. Teufel, R. *et al.* Biochemical Establishment and Characterization of EncM’s Flavin-N5-oxide Cofactor. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 8078–8085 (2015).

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 22-13-00012.

НОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ АЛКИЛАММОНИЕВЫХ АЦИЛГИДРАЗОНОВ И СТЕРИЧЕСКИ-ЗАГРУЖЕННЫХ ПИРОКАТЕХИНОВ

Шайхутдинова З.М.[а,б], Паширова Т.Н.[а,б], Султанова Ж.Н.[а], Сальников В.С., Замалетдинова Д.М.[в], Бухаров С.В.[в], Богданов А.В.[б], Массон П.[а]

[а] Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, 420008, Казань, Кремлевская,18
[б] Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, 420029, Казань, ул. Академика Арбузова, 8
[в] Казанский национальный исследовательский технологический университет, 420015, Казань, ул. Карла Маркса, 68
e-mail: tatyana_pashirova@mail.ru

Современные стратегии терапии болезни Альцгеймера направлены на создание полифункциональных лигандов - ингибиторов холинэстераз. Наибольший интерес представляют обратимые ингибиторы медленного связывания, обладающие длительным временем связывания с ферментом, что позволяет уменьшить дозу и увеличить пролонгированность действия [1]. Четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) на основе стерически-загруженных пирокатехинов обладают широким спектром биологической активности [2]. В настоящий момент наблюдается рост публикаций по созданию новых селективных ингибиторов бутирилхолинэстеразы (БХЭ) или двойных ингибиторов ацетилхолинэстеразы и БХЭ [3]. Целью работы является исследование новых ЧАС на основе стерически-загруженных пирокатехинов в качестве ингибиторов БХЭ и выявление закономерностей структура-свойства на активность БХЭ *in vitro*.

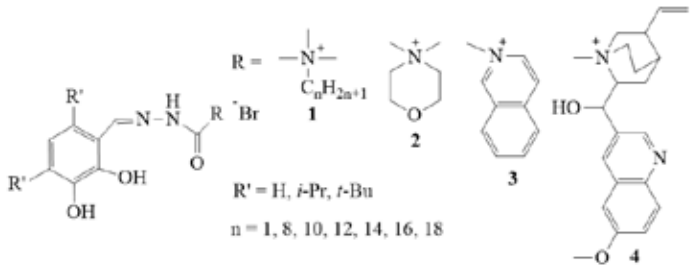


Рисунок 1. *Структура ЧАС на основе стерически-загруженных пирокатехинов.*

Установлено, что длинноцепные аналоги **1** (n=10,14,16,18) и трет-бутильные производные **3** и **4** являются медленно-связывающимися ингибиторами типа А. Из них наиболее низкими значениями константы ингибирования (Ki, K'i) и наибольшим временем удерживания (τ) обладают соединения **1** с n=18 (K'i = 12±1μM, τ = 9 мин), **3** (Ki = 6.1±0.1μM, K'i = 9.1±0.4μM, τ = 3 мин), **4** (Ki = 5.7±0.1μM, K'i = 26.8±0.4μM, τ = 4 мин). Таким образом, новые соединения близки по аффинности с такрином и обладают более длительным временем связывания, что представляет наибольший медицинский интерес.

Литература
1. Lushchekina S.V., Masson P. *Neuropharmacology*, 2020, 177, 108236.
2. Bogdanov A.V. et al. *Russ. J. Gen. Chem.*, 2022, 92(10), 1875-1886.
3. Panek D. et al. *Eur. J. Med. Chemistry*, 2023, 249, 115135.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСАМИНАЗЫ ИЗ *BLASTOCOCCUS SAXOBSIDENS*

Петрова Е.С.,[1] Шилова С.А.,[1,2] Попов В.О.,[2,3] Безсуднова Е.Ю.[2]

[1]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы 1, строение 3,
e-mail: lispetrova@gmail.com
[2]Институт биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия
[3]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые трансаминазы D-аминокислот (DAAT) катализируют стереоселективный и обратимый перенос аминогруппы с D-аминокислоты на кетокислоту с образованием новых D-аминокислоты и кетокислоты. Среди охарактеризованных DAAT выделяется группа гомологичных ферментов с неканонической организацией активного центра, где есть трансаминазы, строго специфичные к D-аминокислотам и специфичные как к D-аминокислотам, так и к первичным (*R*)-аминам [1]. К последним относятся трансаминаза из *Curtobacterium pusilium* (CpuTA) [2] и трансаминаза, обнаруженная нами в геноме бактерии *Blastococcus saxobsidens.*

Трансаминаза из бактерии *B. saxobsidens* (Blasa) была выделена в рекомбинантной форме и охарактеризована структурно и функционально. Blasa активна с широким спектром D-аминокислот и с первичными (*R*)-аминами, в том числе (*R*)-1-фенилэтиламином, (*R*)-1-аминотетралином и т.д. pH-оптимум переаминирования D-аминокислот составил 7.5-8.5, деаминирования первичных (*R*)-аминов – 8.5-9.5. Температурный оптимум реакций с D-аминокислотами составил 40 °C, реакций с R-аминами – 30 °C. В оптимальных условиях константа специфичности к D-глутамату, D-аланину и (R)-1-фенилэтиламину составили 18800 ± 3600, 4000 ± 800, 9 ± 1, соответственно. Энантиомерный избыток продукта реакции для процессов аминирования 4-метил-2-оксовалерата и фенилпирувата составил > 99%.

В результате анализа структуры Blasa в PLP-форме и в комплексе с фенилгидразином предложены остатки, вовлеченные в связывание D-аминокислот, а также структурные особенности, обуславливающие активность фермента с R-аминами. Остатки R34, R96 и S41 могут связывать α-карбоксильную группу D-аминокислот, а остаток R254 может связывать γ-карбоксильную группу субстратов D-глутамата и α-кетоглутарата. Подвижность остатков R34 и R96 в активном центре Blasa способствует продуктивному связыванию (*R*)-1-фенилэтиламина. Ароматическая группа субстрата связывается в полости активного центра, сформированной гидрофобными и положительно заряженными остатками.

Литература
1. Sofia A. Shilova et al. Molecules. 2023, Vol. 28, P. 2109.
2. T. Pavkov-Keller et al. Scientific Reports. 2016, Vol. 6, N. 38183.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-14-00164.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ОКСИДАЗ В ХИТОЗАНОВЫЕ МЕМБРАНЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ

Плешаков В.М., Никитина В.Н., Карякин А.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы 1с13, e-mail: vladislav.pleshakov@chemistry.msu.ru

Электрохимическое определение глюкозы и лактата – важная аналитическая задача в областях биохимии и медицинской диагностики. Принцип работы биосенсоров, способ изготовления которых предлагается в данном исследовании, заключается в ферментативном окислении глюкозы или лактата с образованием пероксида водорода, который далее восстанавливается на электроде [1]. Для высокоселективной детекции пероксида водорода применяются электрокатализаторы его восстановления, одним из которых является берлинская лазурь. Модификация планарных электродов берлинской лазурью проводилась с помощью межфазного или электрохимического синтеза. Для иммобилизации фермента используют различные полимерные материалы, среди которых перспективны такие биополимеры, как, например, хитозан.

Иммобилизация оксидазы проводилась с помощью нанесения раствора фермента в водном растворе хитозана на рабочую поверхность модифицированного берлинской лазурью электрода. Было установлено, что для глюкозооксидазы оптимальное содержание хитозана в мембранообразующей смеси лежит в диапазоне от 0.2 до 0.3 % [2]. При таком содержании биополимера достигается максимум чувствительности биосенсора. Для лактатоксидазы максимум чувствительности биосенсора лежит в диапазоне от 0.005 до 0.1 % хитозана в смеси.

Аналитические характеристики глюкозных биосенсоров были определены при различных значениях pH от 6.0 до 7.4. Было показано, что в линейном диапазоне от $1 \cdot 10^{-6}$ М до $1 \cdot 10^{-3}$ М наибольшая чувствительность достигается при pH 6.5, однако из-за недостаточной стабильности электрокатализатора данные условия не являются оптимальными для практических целей. При pH 6.0 глюкозные биосенсоры показали как достаточно высокую чувствительность, равную 44.1 ± 0.8 мА$\cdot$М$^{-1}\cdot$см$^{-2}$, так и высокую стабильность. При данном значении pH 90% начального отклика на 1 мМ раствор глюкозы сохраняется около 150 минут, а 50% – более 220 минут. Также при pH 6.0 была проверена правильность определения глюкозы в образцах сывороток крови в норме и при патологии при разбавлениях в 50 и 100 раз. Результаты соответствуют паспортным значениям с погрешностью не более 7.3%.

Таким образом, при изготовлении глюкозных и лактатных биосенсоров хитозан может быть успешно использован в качестве иммобилизирующего полимера для глюкозооксидазы и лактатоксидазы.

Литература

1. Karyakin, A. A. Glucose biosensors for clinical and personal use. *Electrochemistry Communications*, 2021, **125**, 106973.
2. Nikitina, V. N., Karastsialiova, A. R., & Karyakin, A. A. Glucose test strips with the largest linear range made via single step modification by glucose oxidase-hexacyanoferrate-chitosan mixture. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, **220**, 114851.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 19-13-00131.

СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ФИТАЗЫ, ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ И КСИЛАНАЗЫ

Рубцова Е.И., Кондратьева Е.Г., Марочкина М.А., Синицына О.А., Синицын А.П.

МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, кафедра Химической энзимологии, 119991, Москва, Ленинские Горы, д.1, стр. 11Б, ГСП-1, oasinitsyna@gmail.com

В МГУ им. М.В. Ломоносова и в Федеральном государственном учреждении «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН» на основе рекомбинантных грибных штаммов *Penicillium verruculosum* были созданы ферментные препараты (ФП) нового поколения для применения в качестве кормовых добавок для рационов сельскохозяйственных животных и птиц. Эти ФП характеризовались повышенным содержанием гомологичной эндо-β-1,4-глюканазы (ЭГ2), характеризующейся высокой активностью по отношению к целлюлозе и β-глюкану; гетерологичной неингибируемой эндо-β-1,4-ксиланазы *P. canescens* (КсилЕ), активной по отношению к ксиланам; и гетерологичной фитазы *Aspergillus niger* (ФитА), характеризующейся высокой активностью по отношению к фитатам. Новые ФП были обогащены как одним, так и одновременно несколькими из вышеперечисленных ферментов в различных сочетаниях: это т.н. «дуплеты» ФитА+ЭГ2, ФитА+КсилЕ, ЭГ2+КсилЕ и «триплет» ФитА+ЭГ2+ КсилЕ, содержавшие до 16-17% ЭГ2, 48-63% КсилЕ, 40-50% ФитА и 17-30% целлобиогидролаз от общего количества белка (при этом содержание т.н. «балластных» с точки зрения применения в качестве кормовых добавок ферментов было низким). Все новые ФП обладали высокой активностью по отношению к некрахмальным полисахаридам (НПС: целлюлозе, β-глюкану и ксилану) и фитатам злаков и не ингибировались их белковыми ингибиторами. Кроме того, на основе новых штаммов *P. verruculosum* были получены ФП, обогащенные термостабильными формами ФитА, ЭГ2 и КсилЕ, характеризовавшимися повышенной устойчивостью к высоким температурами, которые используются при гранулировании комбикормов.

Исследование выполнено за счёт Государственного соглашения 075-15-2021-1071 от 28.09.2021

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ СТАБИЛЬНЫХ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ SAM

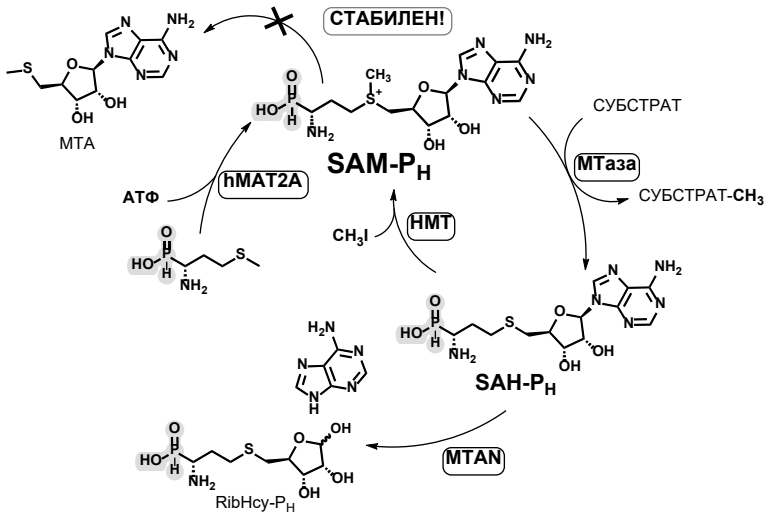
Руденко А.Ю.[а,б] **, Марьясина С.С.**[а,б]**, Болихова А.К.**[в]**, Польшаков В.И.**[а]

[а]МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет Фундаментальной медицины, 119192, Россия, Москва, Ломоносовский пр-т, 27к1
[б]МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119991, Россия, Москва, Ленинские горы, 1с3
[в] МГУ имени М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991, Россия, Москва, Ленинские горы, 1с73
e-mail: RudAlex1303@gmail.com

Молекулы лекарственных средств и других промышленно значимых субстратов часто содержат амино- или гидроксигруппы, а также *N*-гетероциклы. Селективное метилирование этих функциональных групп представляет сложную и важную синтетическую задачу. Реакции метилирования можно проводить ферментативно – с помощью ферментов группы метилтрансфераз. Они обладают хемо-, регио- и стереоселективностью, тем самым могут являться мощным инструментом в функционализации молекул.

Источником метильной группы для реакции ферментативного метилирования является Sаденозилметионин (SAM), однако его широкое использование ограничено внутренней химической нестабильностью, приводящей к разложению с образованием 5'дезокси5'метилтиоаденозина (MTA) и лактона гомосерина.

Данная работа посвящена стабильному фосфорорганическому аналогу **SAM-P$_H$**, который оказался более стабильным, по сравнению с нативным SAM из-за биоизостерического замещения карбоксильной группы на производное фосфиновой кислоты. Мы показали, что такая замена не ухудшает распознавание **SAM-P$_H$** метилтрансферазами. Также мы обнаружили, что фосфинатные аналоги метионина и **SAM-P$_H$** являются субстратами ферментов hMAT2A и HMT, что позволяет получать **SAM-P$_H$** ферментативно. Использование в этих реакциях замещенных предшественников позволяет получать широкий спектр производных SAM-PH. Кроме того мы выяснили, что **SAM-P$_H$** подвергается депуринизации в присутствии MTAN, аналогично природному SAH.



Работа выполняется при финансовой поддержке РНФ, проект 19-14-00115.

МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ В ФОРМАТЕ ИММУНОЧИПА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Саушкин Н.Ю., Самсонова Ж.В., Осипов А.П., Преснова Г.В., Рубцова М.Ю.

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет, кафедра химической энзимологии,
119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 11Б
e-mail: sushk_90@mail.ru

Вакцинопрофилактика является одним из наиболее эффективных мероприятий для предотвращения распространения инфекционных заболеваний в птицеводстве. Частый и массовый контроль птицы диктует необходимость создания планов вакцинации и комбинированного применения сразу нескольких тест-систем для одновременного определения антител к ряду наиболее распространенных инфекций. В виду необходимости контроля сразу нескольких заболеваний в ветеринарной диагностике требуется создание аналитических систем, которые позволяли бы проводить выявление нескольких видов антител одновременно в одной пробе.

Разработан мультиплексный иммуноферментный анализ в формате иммуночипа в виде дискретных зон на лунках полистиролового планшета, позволяющий проводить одновременное определение антител к возбудителям болезни Ньюкасла, инфекционного бронхита и бурсальной болезни кур. Вирусные антигены наносили на аналитическую поверхность в виде круговых микрозон с градиентно увеличивающейся концентрацией с целью получения различного количества окрашенных зон в зависимости от концентрации (титра) специфических антител в исследуемой пробе. Использование разработанного градиентного иммуноанализа в формате иммуночипа позволяет визуально полуколичественно оценить напряженность иммунитета кур по числу окрашенных зон (низкий, средний, высокий уровень иммунного ответа), соответствующих определенному антигену, и при необходимости количественно оценить интенсивность окрашивания микрозон после сканирования.

С помощью иммуноанализа в формате иммуночипа получена высокая корреляция между результатами определения титров антител с коммерческими ИФА-наборами реагентов. Было показано, что в качестве биопроб для количественного и полуколичественного определения титра или диапазона титров антител в формате иммуночипа возможно использование сухих образцов цельной крови. Разработанный мультиплексный градиентный анализ в формате иммуночипа может быть использован для группирования исследуемых сывороток по уровню поствакцинальных антител и оценки напряженности иммунитета кур в птицехозяйствах после проведения профилактических мероприятий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 22-74-00018.

ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ТЕСТЫ ФОТОДЕКАРБОКСИЛАЗЫ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ИЗ *CHLORELLA VARIABILIS*

Семенов О.Ю., Кузнецова Е.А., Натаров И.И., Кузьмин А.С., Михайлов А.Э., Ремеева А.А., Гущин И.Ю.

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Россия, Долгопрудный, Институтский пер, 6а
semenov.oyu@phystech.edu

В последнее время активное использование природных ископаемых и токсичные химические производства создают высокую нагрузку на окружающую среду, угрожая ее состоянию. Одним из ответов на проблему является развитие биотехнологий, которые могли бы позволить использовать вместо ископаемых ресурсов возобновляемые биосинтетические материалы, получаемые при щадящих нейтральных условиях. С этой точки зрения, фотобиокатализ представляется перспективным подходом, так как предоставляет доступ к экологически безопасным и высокоселективным преобразованиям. На данный момент известно только четыре основных семейства фотоферментов [1], из которых недавно открытые фотодекарбоксилазы жирных кислот (ФЖК) являются наиболее перспективными для применения в промышленности.

Открытая в 2017 году ФЖК из *Chlorella variabilis* (CvFAP) продемонстрировала активность в отношение широкого спектра субстратов, однако в то же время имела низкую стабильность и малую активность в отношении ряда важных субстратов [2]. Поэтому были предприняты попытки как повысить стабильность фермента, так и изменить его специфичность [3]. Хотя и были достигнуты некоторые успехи, существует большой потенциал для дальнейших усовершенствований ФЖК.

В данной работе нами был проанализирован ряд генетических конструкций ФЖК из *Chlorella variabilis* (CvFAP) с точки зрения экспрессии и очистки фермента для выбора наиболее оптимальной для работы. Была определена конструкция с повышенным в 1.4 раза уровнем экспрессии, продемонстрирована каталитическая активность очищенного белка и исследована зависимость степени олигомеризации от условий очистки. Предложены мутации, увеличивающие стабильность ФЖК.

Литература

1. Björn L.O. Photoenzymes and Related Topics: An Update // Photochemistry and Photobiology. – 2018. – Vol. 94. – Photoenzymes and Related Topics. – № 3. – P. 459-465.
2. Wu Y. [et al.] Stabilisation of the Fatty Acid Decarboxylase from Chlorella variabilis by Caprylic Acid // ChemBioChem. – 2021. – Vol. 22. – № 14. – P. 2420-2423.
3. Hedison T.M. [et al.] Making molecules with photodecarboxylases: A great start or a false dawn? // Current Research in Chemical Biology. – 2022. – Vol. 2. – Making molecules with photodecarboxylases. – P. 100017.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках выполнения проекта № FSMG-2021-0002 по теме «Молекулярно-биологические основы создания противовирусных препаратов и быстрой разработки вакцин на базе самособирающихся комплексов рекомбинантных химерных белков».

НОВАЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ ДОБАВКА К КОРМАМ ДЛЯ МОНОГАСТРИЧНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ОСНОВЕ ГРИБНОЙ МУРАМИДАЗЫ

Короткова О.Г.,[1] Семенова М.В.,[1] Рожкова А.М.,[1] Егоров И.А.,[2] Егорова Т.В.,[2] Синицын А.П.[1]

[1]ФИЦ Биотехнологии РАН,
119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2,
e-mail: littletempo@yandex.ru
[2]ФНЦ «ВНИТИП» РАН,
141311, Московская область, г. Сергиев Посад, ул. Птицеградская, д. 10

Основным направлением для улучшения потребительских показателей в промышленном птицеводстве и животноводстве традиционно применяются кормовые антибиотики. Они обеспечивают увеличение скорости роста птицы и животных и способствуют профилактике и лечению заболеваний. Однако, применение антибиотиков сопровождается побочными негативными эффектами: происходит их накопление в органах и тканях, растет число возбудителей болезней. Таким образом, применение антибиотиков негативно сказывается на потребительских качествах мясной продукции, что делает актуальной проблему поиска их замены.

В качестве альтернативы антибиотикам особый интерес представляют ферменты, обладающие антибактериальной активностью на основе аналога животного лизоцима. К таким ферментам относятся - N-ацетилмурамидазы (КФ 3.2.1.17), продуцируемые микроскопическими грибами. N-ацетилмурамидаза расщепляет β-1,4-гликозидные связи между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином, являющимися основными элементами углеводной основы пептидогликанов клеточных стенок бактерий.

С помощью методов генетической инженерии нами были созданы штаммы-продуценты грибных мурамидаз на базе рекомбинантного штамма *Penicillium verruculosum.* Получены ферментные препараты, содержащие муромидазы *P.verruculosum* и *A.oryzae*.

Ферменты были выделены в индивидуальном виде и изучена их антибактериальная активность. Следует отметить, что штамм *P.verruculosum* является природным продуцентом ферментов β-глюканаз и ксиланаз, разрушающих некрахмальные полисахариды (НПС) злаков – одних из основных антипитательных факторов кормов сельскохозяйственных животных и птицы. Таким образом, ферментные препараты, получаемые на основе продуцентов мурамидаз, дополнительно обладают способностью к разрушению НПС.

Работа выполнена при финансовой поддержке КПНИ ФНТПР сельского хозяйства на 2017-2030 годы, проект №122112300051-8.

ПОИСК И КЛОНИРОВАНИЕ НОВЫХ ПОЛИАМИНОКСИДАЗ ИЗ OGATAEA PARAPOLYMORPHA DL-1

Сергеев Е.П.,[а, б, в] **Головина Д. И.,**[а, б, в] **Атрошенко Д.Л.**[а, б, в, г]

[а]Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3, e-mail: egor.sergeev@chemistry.msu.ru
[б]Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, институт биохимии имени А.Н. Баха, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2,
[в]Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», институт базового образования, 119049, Москва, Ленинский проспект, 4, стр. 1,
[г]Российский университет дружбы народов, медицинский институт, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6,

FAD-зависимые оксидоредуктазы делятся на 6 классов: оксидазы ванилиловых спиртов, сульфгидрилоксидазы, ацетил-КоА оксидазы, оксидазы аминов, оксидазы 2-гидроксикислот и глюкоз-метанол-холиноксидазы. Среди половины из этих классов есть ферменты, нашедшие активное применение в биотехнологии. Так, глюкозоксидаза и лактатоксидаза используются для анализа глюкозы и лактата в крови и других биологических жидкостях. Аминоксидазы используют в сенсорах на биогенные амины, которые могут свидетельствовать о порче пищевых продуктов или раковых заболеваниях. В частности, повышение концентрации спермидина в моче и плазме крови коррелирует с наличием рака печени.

Таким образом, поиск новых полиаминоксидаз является перспективным направлением. Недавние работы по исследованию оксидаз D-аминокислот из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 показали, что сходные по своей ферментативной активности ферменты даже из 1 организма могут обладать весьма низкой гомологией. Но их структуры, полученные при помощи программы AlphaFold, крайне похожи друг на друга. Также недавно был представлен сервис FoldSeek, позволяющий проводить поиск на основании структуры, а не аминокислотной последовательности. Это открывает возможности для поиска ферментов и предварительного анализа их потенциальных субстратов.

В ходе работы был произведен биоинформатический анализ генома *Ogataea parapolymorpha* DL-1. В его процессе были отобраны все гены, кодирующие FAD-зависимые ферменты. Из них были отобраны все гены, которые аннотировались в Pfam как члены суперсемейств FAD-зависимых оксидаз. Для последующего анализа структуры соответствующих белков брали из базы данных AlphaFold Protein Structure Database. При помощи FoldSeek среди баз данных PDB и AlphaFold/Swiss-Prot v4 проводили поиск похожих структур. Было найдено 3 гена, потенциально кодирующих полиаминоксидазы. Они были клонированы в плазмиду pET28a. Провели экспрессию соответствующих ферментов в клетках *Escherichia coli*. Одна из полиаминоксидаз проявила активность со спермином, что подтверждает предсказание ферментативной активности.

Работа была выполнена в рамках выполнения государственного задания.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АПТАСЕНСОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АФЛАТОКСИНА B1

Серебренникова К.В., Самохвалов А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119991, Москва, Ленинский проспект 33, e-mail: ksenijasereb@mail.ru

Аптамеры представляют собой синтетические олигонуклеотиды, специфически связывающие определенные молекулы-мишени [1]. Простота синтеза и модификации аптамеров, а также их стабильность к денатурирующим воздействиям обуславливают интерес к применению аптамеров в биосенсорных системах. Сочетание аптамеров с короткими комплементарными нуклеиновыми кислотами (оцНК) позволяет настраивать аналитические характеристики таких систем, изменяя длину и положение участка связывания комплементарной оцНК [2].

В данной работе предложен флуоресцентный аптасенсор на основе лиганд-индуцированного ингибирования Ферстеровского резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) между комплексом меченного флуоресцеином (FAM) аптамера (флуорофор), специфичного к низкомолекулярному аналиту, и короткой комплементарной оцДНК, меченной низкомолекулярным тушителем RTQ-1. Аналитом являлся афлатоксин B1 (АфлВ1) – контаминант пищевых продуктов, обладающий мутагенными, гепатотоксичными и тератогенными свойствами [3]. В аптасенсоре использовали специфичный к афлатоксину B1 меченый флуорофором аптамер с последовательностью 5′-(FAM)-AT CAC GTG TTG TCT CTC TGT GTC TCG TG-3′ (FAM–Апт) и меченую тушителем комплементарную оцДНК 5′-GAG ACA ACA CGT G-(RTQ-1)-3′ (RTQ1–оцДНК). Установлены оптимальные концентрационные соотношения FAM-Апт и RTQ1-оцДНК для максимального тушения флуоресценции по механизму FRET. Добавление АфлВ1 приводило к ингибированию формирования комплекса аптамер–оцДНК и восстановлению флуоресценции FAM–Апт. Линейная зависимость флуоресценции от концентрации АфлВ1 наблюдалась в диапазоне от 20 до 664 нМ с пределом обнаружения 7 нМ. Время анализа составило 5 минут. Показана эффективность разработанного аптасенсора для определения АфлВ1 в пробах белого вина.

Литература

1. Yu H., Alkhamis O., Canoura J., Liu Y., Xiao Y. *Angew. Chem. Int. Ed.,* 2021, **60**(31), 16800-16823.
2. Shaban S.M., Kim D-H. *Sensors*, 2021, **21**(3), 979.
3. Yadav N., Yadav S.S., Chhillar A.K., Rana J.S. *Food Chem. Toxicol., 2021,* **152, 112201.**

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 21-74-20155.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАД(Ф) Н-ЗАВИСИМОЙ ГЛУТАМАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *PANTOEA ANANATIS*

Скрипникова В.С., Ростова Ю.Г., Харченко М.С., Бабаева М.Н., Закатаева Н.П.

АО «НИИ Аджиномото-Генетика»,
117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1, корп. 1,
e-mail: Victoria_Skripnikova@agri.ru

Благодаря различным полезным характеристикам, таким как способность расти на простых синтетических средах, в том числе и при низких значениях pH, и продуцировать целый ряд полезных веществ штаммы грамотрицательной бактерии *Pantoea ananatis* являются перспективными объектами для биотехнологической промышленности. В настоящее время пути усвоения азота клетками *P. ananatis* подробно не изучены. Одним из основных ферментов метаболизма азота является глутамат дегидрогеназа (ГДГ), катализирующая обратимое превращение α-кетоглутарата в глутамат. Несмотря на схожесть многих генов, их продуктов и путей метаболизма у *P. ananatis* и *E. coli*, ближайшим гомологом ГДГ из *P. ananatis* (ГДГ-Pan), является не ГДГ из *E. coli* (ГДГ-Eco), а пока не охарактеризованная ГДГ из *Burkholderia thailandensis*. Наши предварительные эксперименты показали, что в отличие от НАДФН-зависимой ГДГ-Eco, ГДГ-Pan обладает двойной кофакторной специфичностью к НАД(Ф)Н, что характерно для эукариотических ГДГ и довольно редко встречается у бактерий. В данной работе подробно изучены биохимические свойства очищенного рекомбинатного белка ГДГ-Pan, наработанного и выделенного из *E. coli*.

Препарат ГДГ-Pan получали путем очистки рекомбинантного белка HT-TEV-ГДГ-Pan методом металл аффинной хроматографии и последующего удаления полигистидиновой метки, по нашим данным негативно влияющей на активность фермента. Для полученного таким образом высоко гомогенного белка ГДГ-Pan были определены специфическая ГДГ-активность, pH-оптимум и основные биохимические константы.

Было обнаружено, что фермент активен в НАДН- и НАДФН-зависимых реакциях с оптимумом pH 8.0, а также в НАД- и НАДФ-зависимых реакциях с оптимумом pH 6.0 – 6.5 и 9.5, соответственно. Определение констант Михаэлиса (*Km*) и максимальной скорости реакции (*Vmax*) для всех кофакторов и субстратов ГДГ-Pan показало, что фермент обладает наибольшим сродством в отношении НАДФ, НАДФН и α-кетоглутарата. Каталитические эффективности (*kcat/Km*) для НАДН- и НАДФН-зависимых реакций имели высокие и сходные значения (~ $6x10^4$), в то время как значения *kcat/Km* для НАД- и НАДФ-зависимых активностей были относительно низкими и значительно различались ($9.96x10^3$ против $1.18x10^3$).

Согласно результатам кинетического анализа в условиях избытка солей аммония ГДГ-Pan катализирует превращение α-кетоглутарата в глутамат с примерно одинаковой потребностью в кофакторах (НАДН или НАДФН). Фермент также способен использовать либо НАД, либо НАДФ в обратной реакции (с большей активностью в присутствии НАД), однако он обладает сравнительно низким сродством к глутамату.

Таким образом, ГДГ-Pan обладает двойной кофакторной специфичностью. Это свойство ферментов может обеспечивать клетке гибкость регулирования метаболических путей и давать преимущество в выживании при динамичных и стрессовых условиях.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ТЕСТ-ПОЛОСКИ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЛЮКОЗЫ НА ОСНОВЕ ТРЕХКОМПОНЕНТНЫХ МЕМБРАНООБРАЗУЮЩИХ СМЕСЕЙ

Соловьёв И.Д., Никитина В.Н.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия
e-mail: solovyevid@my.msu.ru

Для определения концентрации глюкозы удобно использовать электрохимические глюкометры, принцип работы которых основан на ферментативной реакции. Для регистрации сигнала в виде тока используются диффузионно-подвижные электрохимически активные вещества – медиаторы.

Цель работы: разработка мембранообразующих смесей для одностадийной модификации электродов и изготовления глюкозных тест-полосок для одноразового и многоразового использования. В данной работе изучили подвижность медиаторов в биосовместимых мембранах различного заряда на основе полисилоксана, хитозана, перфторсульфонированного полимера. Данные мембраны применяются в качестве матриц, удерживающих медиатор и глюкозооксидазу на поверхности электрода. Показано влияние заряда полиэлектролита и количества полимера в мембране (толщины мембраны) на диффузионную подвижность заряженных медиаторов. Методом циклической вольтамперометрии с помощью уравнения Рэндлса-Шевчика определены эффективные коэффициенты диффузии трёх медиаторов (гексацианоферрат, ферроцендиметанол, гексамминорутений) в зависимости от используемой мембраны. В качестве оптимальной мембраны, позволяющей контролировать диффузию заряженных медиаторов, был выбран биополимер хитозан. Получены зависимости коэффициентов диффузии ферроцендиметанола, гексацианоферрата (III) и гексамминорутения (III) от концентрации хитозана в мембранообразующей смеси и pH внешнего раствора, а также определена скорость высвобождения медиаторов, иммобилизованных на электроде в составе хитозановой мембраны.

Были получены одноразовые и многоразовые биосенсоры с широким диапазоном линейности амперометрического отклика от концентрации глюкозы (1 – 30 мМ) путем одностадийного капельного нанесения на поверхность печатных электродов мембранообразующих смесей упомянутых ранее и водонерастворимого медиатора (ферроцен) и перфторсульфонированного полимера в качестве матрицы, соответственно. Наилучшими аналитическими характеристиками обладают тест-полоски на основе гексацианоферрата (III) и глюкозооскидазы, иммобилизованных в 0,01% хитозановой мембране: диапазон линейности отклика от 1 до 50 мМ и коэффициент чувствительности 18 ± 4 мА $М^{-1}$ $см^{-2}$.

Таким образом, правильно подобрав медиатор и полиэлектролит, нанесенные на электрод в одну стадию в составе мембранообразующей смеси, можно получить широкий линейный диапазон определяемых концентраций, соответствующий содержаниям глюкозы в цельной крови.

Литература
[1] Nikitina V. N., Karastsialiova A. R., Karyakin A. A. Glucose test strips with the largest linear range made via single step modification by glucose oxidase-hexacyanoferrate-chitosan mixture. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, **220**, 114851.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 22-23-00545)

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОДНОГЕМОВЫХ ЦИТОХРОМОВ С – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АКЦЕПТОРОВ ЭЛЕКТРОНОВ В РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗОЙ

Соловьева А.Ю.,[а] Дергоусова Н.И.,[а] Бочаров Э.В.,[б] Варфоломеева Л.А., Устинникова Т.Б., Тихонова Т.В.,[а] Попов В.О.[а]

[а]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2
[б]Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
e-mail: nastya.soloveva1@yandex.ru

Бактерия *Thioalkalivibrio paradoxus* способна к росту на тиоцианате в качестве единственного источника энергии и азота. Медь-содержащий фермент тиоцианатдегидрогеназа (TcDH) катализирует первую стадию разложения тиоцианата с образованием цианата, молекулярной серы и переносом двух электронов на внешний акцептор с последующим включением их в дыхательную цепь [1].

Целью настоящей работы был поиск и характеристика белков, способных принимать электроны от TcDH *in vitro* и потенциально выполнять функцию акцептора *in vivo*. В этой роли были рассмотрены два эндогенных одногемовых цитохрома С552 и С546/556 с молекулярными массами 18 и 8 кДа. Оба цитохрома соочищались вместе с TcDH в процессе выделения. Экспрессия гена С552 росла при культивировании бактерий *Tv. paradoxus* на тиоцианате параллельно с ростом уровня экспрессии гена TcDH. Получены рекомбинантные формы обоих цитохромов. В экспериментах *in vitro* показано, что оба цитохрома могут выполнять функцию акцептора электронов в реакции окисления тиоцианата, катализируемой TcDH. Проведено потенциометрическое титрование обоих цитохромов. Редокс потенциалы гемов с равны 167 и 90 мВ для С552 и С546/556, соответственно. Для обоих цитохромов были получены пространственные структуры: структура С546/556 – методом рентгеноструктурного анализа, структура С552 – методом ЯМР. Для картирования потенциального сайта связывания С552 с TcDH были использованы изменения химических сдвигов ЯМР при образовании комплекса. Построена модель комплекса и сформулирована наиболее вероятная цепь переноса электронов из активного центра TcDH на гем С552. Интересной особенностью цитохрома С552 является наличие длинных неупорядоченных His-содержащих мотивов на С- и N-концах полипептидных цепей, которые нетипичны для цитохромов с класса I. Показана способность His-мотивов связывать ионы меди. С целью изучения функции His-мотивов был получен укороченный рекомбинантный белок С552short. Гомогенный препарат С552short не отличался по спектральным свойствам от полноразмерного цитохрома, а вот активность TcDH с С552short в качестве акцептора электронов была в 2 раза ниже, чем с полноразмерным С552. Получены кристаллы С552short.

Литература
1. Tikhonova, T.V., Sorokin, D.Y., Hagen, W.R., Khrenova, M.G., Muyzer, G., Rakitina, T.V., Shabalin, I.G., Trofimov, A.A., Tsallagov, S.I., Popov, V.O. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, **117**, 5280-5290.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, грант № 23-74-30004.

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЗЕАРАЛЕНОНА В ПРОДУКТАХ РАСТЕНИЕВОДСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ

Стацюк Н.В., Щербакова Л.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии,
143050, Московская область, Большие Вяземы, ул. Институт, вл. 5,
email: nataafg@gmail.com

Зеараленон (ЗЕА) относится к наиболее распространенным фузариотоксинам, загрязняющим агропродукцию. Деконтаминация загрязненной им продукции может быть осуществлена путем биодеструкции различными микроорганизмами, однако их практическое применение возможно только при условии необратимой трансформации токсина. Для ЗЕА известны два пути необратимой биотрансформации (раскрытие лактонного кольца или разрушение кетон-карбонильной группы при атоме С6'), а также обнаружены ферменты, вовлеченные в эти пути. В то же время, авторы многих публикаций не уточняют пути трансформации ЗЕА исследуемыми микроорганизмами, что усложняет поиск потенциальных доноров ферментов для эффективной детоксификации кормовой и пищевой продукции.

Основываясь на собственных исследованиях в этой области, а также на анализе публикаций других авторов, мы обобщили данные о таксонах бактерий и грибов, наиболее перспективных для поиска потенциальных доноров ЗЕА-детоксифицирующих ферментов, а также об их эффективности и условиях применения[1]. В итоговый список вошли микроорганизмы, для которых необратимость трансформации токсина была показана одними или несколькими способами: подтверждение отсутствия эстрогеноподобных метаболитов методами масс-спектрометрии и/или биотестами; подтверждение способности микроорганизма катаболизировать ЗЕА как единственный источник углерода; выявление генов, кодирующих ферменты, аналогичные ферментам, участвующим в необратимой трансформации; а также выделение и идентификация целевого фермента (Табл. 1).

Таблица 1. *Микроорганизмы, необратимо трансформирующие зеараленон*

Микроорганизм (род, виды)	Эффективность трансформации, %
Bacillus (B. natto, B. subtilis, B. pumilis, B. velezensis)	75–100
Rhodococcus (R. ruber, R. erythropolis, R. percolatus, R. pyridinivorans)	50–95
Acinetobacter sp.	~100
Pseudomonas sp.	~100
Clonostachys rosea	68–90
Trichosporon mycotoxinivorans	95

Литература
1. Statsyuk N.V., Popletaeva S.B., Shcherbakova L.A. Post-harvest prevention of fusariotoxin contamination of agricultural products by irreversible microbial biotransformation: current status and prospects. *BioTech*, 2023, **12(2)**, 32.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 22-16-00153.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ НА ОКСИД ЦИРКОНИЯ

Сульман А.М., Гребенникова О.В., Балакшина Д.В., Матвеева В.Г.

Тверской государственный технический университет,
170026, Тверь, наб. Афанасия Никитина, 22
e-mail: alexsulman@mail.ru

Иммобилизованные ферменты широко используются при синтезе различных сложных лекарственных средств и их промежуточных соединений в мягких условиях без образования токсичных побочных продуктов. Они используются для рекультивации загрязненной воды, воздуха и почвы, эффективно устраняя органические загрязнители, диагностируя заболевания и корректируя различные генетические синдромы, вызванные дефицитом метаболических ферментов. В промышленных масштабах используется иммобилизованный фермент - глюкозооксидаза (GOx, КФ 1.1.3.4, семейство оксигеназ, подкласс оксидоредуказ). GOx используется в пищевой промышленности и медицине для измерений содержания глюкозы в реальном времени и на месте биосенсорами. Создание носителей для иммобилизации GOx позволяет сохранить их активность, чувствительность в расширенных диапазонах для биосенсоров глюкозы. Другое важное использование иммобилизации GOx - это создание биокатализатора для получения D-глюконовой кислоты, которая сама и ее соли используются в качестве лекарств, витаминов и пищевых добавок.

В данной работе для иммобилизации GOx был синтезирован мезопористый ZrO_2 методом реплики, где в качестве жесткого шаблона использовался мезопористый диоксид кремния с размером пор 6 нм. По данным изображения просвечивающей электронной микроскопии было установлено, что формирование наночастиц магнетита происходит именно в порах исходного оксида циркония и размер наночастиц не превышает размера пор. Исходные оксиды и их магнитные аналоги использовались в качестве подложек для иммобилизации фермента GOx. Гетерогенные биокатализаторы на основе GOx, иммобилизованного на оксидах циркония, были исследованы в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в интервале pH 4-8 при T 40 °C. Магнитные биокатализаторы имеют более высокую эффективность по сравнению с исходными оксидами циркония, что вероятно связано с влиянием наночастиц оксида железа, обладающих ферментоподобной активностью. Влияние температуры на окисление D-глюкозы изучалось в интервале от 30 до 70 °C при pH 6. При 40 °C нативный GOx проявляет максимальную активность (~100%) и впоследствии происходит резкое снижение до 73% при 50 °C, в то время как иммобилизованные биокатализаторы, как видно из приведенных данных, менее чувствительны к изменениям температуры. При 60 °C нативный фермент теряет около 60% каталитической активности, тогда как активность гетерогенных биокатализаторов снижается лишь на 4-18% в зависимости от типа носителя. Среди иммобилизованных биокатализаторов наилучшие результаты были получены для Fe_3O_4-ZrO_2-600-GOx с относительной активностью 98% при 40-45 °C.

При проведении десяти последовательных циклов лучший магнитоотделяемый биокатализатор Fe_3O_4-ZrO_2-600-GOx (относительная активность 98%) теряет только 7% своей активности, что объясняется высокой износостойкостью ZrO_2. Высокая ферментативная активность биокатализаторов делает их перспективными для практического применения в широком диапазоне pH и температуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента МК-4300.2022.1.3.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ НА ГЕТЕРОГЕННЫХ НОСИТЕЛЯХ, СОДЕРЖАЩИХ МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

Сульман А.М., Гребенникова О.В., Тихонов Б.Б., Долуда В.Ю., Матвеева В.Г.

Тверской государственный технический университет, 170026, Тверь, наб. Афанасия Никитина, 22
e-mail: alexsulman@mail.ru

Носители, содержащие магнитные наночастицы (НЧ), для каталитических и биокаталитических систем, получили значительное внимание, поскольку они позволяют улучшить интенсификацию процесса и экономию как энергии, так и материалов за счет магнитного отделения[1]. В процессах периодического действия магнитная сепарация обеспечивает легкое отделение катализатора и его дальнейшее повторное использование. Магнитное отделение иммобилизованных ферментов обычно осуществляется путем связывания ферментов с магнитными НЧ посредством некоторых связующих агентов, таких как полимеры, дифункциональные молекулы и т.д.[2]. Чтобы создать заметный магнитный момент для успешного разделения, магнитные наночастицы часто организуются в кластеры, внедряются в гели, другие полимерные или неорганические матрицы или самособираются в более крупные структуры. Значительное усиление активности фермента наблюдалось, когда оба фермента и НЧ оксида железа располагались поблизости друг от друга.

Важным преимуществом магнитных биокатализаторов является направленно разработанная иерархическая пористость магнитных подложек, которая широко используется для контролируемой иммобилизации ферментов при дизайне эффективных биокатализаторов. Преимущества иерархической пористости включают легкий массоперенос реагирующих молекул в больших порах, оптимальную самосборку молекул фермента внутри пор среднего размера (что приводит к повышению активности фермента) и сохранение структурной целостности биокатализатора за счет малых пор.

Модификация поверхности зависит от способа получения магнитного носителя и от компонентов биокатализатора. При модификации поверхности магнитных носителей преследуются две основные цели. Один из них сосредоточен на функционализации носителей с такими группами, как альдегидная, амино, диимидная, карбоксильная, гидроксильная и т.д. для дальнейшего связывания ферментов и других модифицирующих молекул3. Функциональные группы могут быть получены путем присоединения дифункциональных молекул, полимеров, дендримеров или олигомеров. Другая цель модификации поверхности связана с настройкой баланса гидрофобности и гидрофильности для лучшей совместимости фермента, носителя и субстрата.

Литература
1. Lawson B.P., Golikova E., Sulman A.M., Stein B.D., Morgan D.G., Lakina N.V., Karpenkov A.Y., Sulman E.M., Matveeva V.G., Bronstein L.M. *ACS Sustainable Chem. Eng.,* 2018, **6**, 9845.
2. Krishnan B.P., Prieto-Lopez L.O., Hoefgen S., Xue L., Wang S., Valiante V., Cui J. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2020, **12**, 20982.
3. de L.J.M., Furlani I.L., da S.L.R.G., Valverde A.L., Cass Q.B. *Anal Methods*. 2020, **12**, 4116.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 22-79-00052).

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ СВЕРХВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ

Телицин В.Д.[1,2], Семенова М.В.[2], Синицын А.П.[2]

[1] Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова г. Архангельск;
[2]ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071 Российская Федерация,
г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2,
e-mail: vadim.telitsin@gmail.com

Работа с субстратами при их высокой концентрации в реакционной смеси (более 150 г/л) дает преимущества при масштабировании процессов биокаталитической конверсии растительной биомассы, что приводит к снижению капитальных затрат, эксплуатационных расходов, потребности в энергии и увеличению концентрации сахаров в реакционной смеси после окончания процесса. Однако, существует ряд факторов, препятствующих увеличению концентрации субстрата сверх определенной нормы, в том числе недостаточное эффективное перемешивание реакционной смеси из-за высокой вязкости среды, ограничения по массо- и теплообмену, ингибирование ферментов компонентами субстрата или сахарами (продуктами) – все это снижает эффективность процесса биокаталитической конверсии.

Существует несколько подходов для нивелирования этих проблем, заключающихся в оптимизации состава ферментного комплекса за счет включения туда гемицеллюлаз (ксиланаз) или пектиназ для деструкции различных компонентов растительной биомассы, использование некаталитических белков (сапонина, альбумина) и ПАВов. При этом, как правило, для достижения приемлемой степени конверсии увеличение концентрации субстрата компенсируется увеличением дозировки ферментов, что увеличивает себестоимость получаемых сахаров. Подходящим способом конверсии растительной биомассы с высокой концентрацией в реакционной смеси является режим биокаталитической конверсии с подпиткой субстратом. Этот режим включает периодическое или непрерывное добавление субстрата, помогает поддерживать его оптимальную концентрацию, снижает вязкость реакционной смеси и способствует интенсификации массо- и теплообмена. Такой подход приводит к высокой эффективности процесса биоконверсии растительного сырья.

Нами был подобран ферментный препарат, состоящий из целлюлаз (целлобиогидролаз, эндоглюканаз, β-глюкозидазы) и гемицеллюлаз (эндоксиланазы), позволяющий эффективно разжижать раствор небелёной сульфатной лиственной целлюлозы (полуфабриката целлюлозно-бумажного производства) с концентрацией до 400 г сухого вещества субстрата/л. При этом наблюдалось не менее 90% конверсии субстрата в сахара, в основном глюкозу и ксилозу.

Ферментный комплекс, включающий целлюлазы, арабиназы и пектиназу, эффективно снижал вязкость раствора измельченного свекловичного жома с концентрацией до 300 г сухого вещества субстрата/л. Конверсия жома в сахара составляла не менее 50%, а среди моносахаридов преимущественно накапливались глюкоза, фруктоза и арабиноза.

В обоих случаях дробное внесение субстрата в реакционную смесь позволило снизить количество используемого ферментного препарата в 1,5-2 раза без существенной потери в выходе конечных продуктов.

Работа выполнена за счет гранта РНФ (проект № 22-24-20136).

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАЗ НА ОСНОВЕ ОКИСЛЕНИЯ ОСТАТКОВ ТИРОЗИНА МОДЕЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ

Филиппова Т.А.,[а,б] Масамрех Р.А.,[а,б] Шумянцева В.В.,[а,б] Фарафонова Т.Е.,[а,б] Мошковский С.А.,[б] Кузиков А.В.[а,б]

[а] ИБМХ, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8
[б] ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
e-mail: lipivif@gmail.com

В связи с широким применением протеаз в различных биотехнологических отраслях и изучением их роли в развитии патологических процессов актуальной является разработка новых высокоэффективных подходов к определению активности этих ферментов. Среди существующих на сегодняшний день подходов к определению активности протеаз, электрохимические подходы имеют ряд преимуществ, таких как высокая чувствительность, возможность миниатюризации аналитического процесса и удобство практического использования. Известно, что ряд аминокислот подвергается необратимому электрохимическому окислению и этот процесс может быть зарегистрирован с помощью электрохимических методов. Мы предположили, что это может быть использовано для определения протеазной активности ферментов. Существенным преимуществом предложенного подхода является отсутствие необходимости включения дополнительной редокс-метки в процессе синтеза пептидов. Нами была разработана электрохимическая система для определения активности трипсина, основанная на электрохимическом окислении остатков тирозина модельных пептидов, имеющих специфические сайты расщепления трипсином [1]. Пептиды были иммобилизованы на поверхности модифицированных наночастицами золота печатных графитовых электродов (ПГЭ). После инкубации пептидов, иммобилизованных на ПГЭ, с различными концентрациями трипсина, наблюдалось время-зависимое расщепление пептидов и уменьшение сигнала электроокисления остатков тирозина, по которому регистрировалась активность трипсина. На основании полученных электрохимических данных нами были рассчитаны параметры стационарной кинетики трипсина. Разработанная электрохимическая система была использована для сравнительного анализа кинетических параметров и специфичности трипсина по отношению к модельным пептидам с различной аминокислотной последовательностью. Мы показали, что разработанная система применима для оценки специфичности протеаз. Предложенный нами оригинальный подход к определению протеазной активности ферментов может быть использован для изучения свойств других протеаз, имеющих биотехнологическое и медицинское значение.

Литература
1. Filippova T.A., Masamrekh R.A., Shumyantseva V.V., Latsis I.A., Farafonova T.E., Ilina I.Y., Kanashenko S.L., Moshkovskii S.A., Kuzikov A.V. *Talanta, 2023,* **257, 124341.**

Работа выполнена в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой дизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение No 075-15-2022-305).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ СУБСТРАТОВ В АКТИВНЫХ ЦЕНТРАХ ГИДРОЛАЗ

Хренова М.Г.,[а,б] Кулакова А.М., Кривицкая А.В.[а]

[а] ФИЦ Биотехнологии РАН, 119991, Москва, Ленинский проспект 33с2,
e-mail: mkhrenova@lcc.chem.msu.ru
[б] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские Горы, 1с3

В литературе накоплен колоссальный экспериментальный материал по субстратной специфичности гидролаз различного типа, включая сериновые, цистеиновые и металл-зависимые, проводящих разрыв связей C–N, C–O и C–C. Также представлены исследования по систематизации полученных данных на основе биоинформатического анализа. Главным образом, такой анализ сводится к определению комплементарности аминокислотных остатков сайтов связывания субстратам. При этом важно, что аминокислотные остатки, формирующие активный центр достаточно консервативны. В качестве нуклеофильной частицы выступают функциональные группы боковых цепей аминокислотных остатков серина или цистеина в сериновых и цистеиновых гидролаз соответственно. В металл-зависимых гидролазах нуклеофилом являеся молекула воды или гидроксид анион. Другим важным участником реакции является оксианионный центр, образующий водородные или координационные связи с атомом карбонильного кислорода субстрата. В литературе ему приписывается роль стабилизации первого переходного состояния и тетраэдрического интермедиата реакции гидролиза. Таким образом, биоинформатический анализ скорее может дать ответ на вопросы, относящиеся к комплементарности субстратов и сайтов связывания гидролаз, частично отражающейся на реакционной способности. Однако биоинформатический анализ не способен объяснить причины, лежащие в основе различной реакционной способности, проявляющейся в изменении константы скорости реакции с разными субстратам, что представляет интерес для фундаментальной науки.

Определить причины различной реакционной способности можно в рамках молекулярного моделирования, основанного на квантовой теории, позволяющей количественно описать и охарактеризовать межатомные и межмолекулярные взаимодействия в активных центрах ферментов. Поэтому в рамках данной работы представлены результаты изучения динамического поведения фермент-субстратных комплексов с помощью метода молекулярной динамики с комбинированными потенциалами квантовой механики / молекулярной механики с последующим количественным анализом взаимодействий фермента и субстрата и характеризацией активации субстрата ферментом с помощью дескрипторов электронной плотности. Предполагается, что фермент-субстратные комплексы можно разделить на реакционные и нереакционные, различающиеся активацией карбонильного углерода субстрата, а соотношение реакционных и нереакционных структур влияет на энергетический профиль последующей стадии нуклеофильной атаки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации, проект МД-1390.2022.1.4.

ОПТИМИЗИРОВАННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ГЕНА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛИТИКАЗЫ ИЗ БАКТЕРИЙ *C.CELLULANS*

Черкашина А.С., Пика М.И., Михеева О.О., Фролова А.Ю., Акимкин В.Г.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора,
111123, Россия, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а,
cherkashina@pcr.ms

Литиказа – фермент, относящийся к классу β-1,3-глюканаз (КФ 3.2.1.29) и катализирует гидролиз глюканов, содержащих -1,3-связанные мономеры глюкозы. Глюканы - это один из самых распространенных полисахаридов, присутствующих в клеточной стенке дрожжей. β-1,3-глюканазы вырабатываются бактериями и грибами как часть внеклеточного комплекса ферментов, которые, действуя синергетически, способны лизировать жизнеспособные дрожжевые клетки.

На практике использование ферментативной стадии предобработки образцов, содержащих дрожжевые патогены, позволяет облегчить процесс выделения нуклеиновых кислот дрожжевых возбудителей. Целью данной работы являлась разработка уникальной оптимизированной последовательности гена, кодирующего литиказу из бактерий *C.cellulans*, экспрессия, выделение и очистка рекомбинантного фермента и характеристика его свойств.

С использованием генно-инженерных методов в работе была получена уникальная последовательность гена с оптимизированным составом кодонов, фермент был проэкспрессирован в клетках *E.coli* в растворимой форме. С целью оптимизации условий экспрессии рекомбинантного фермента был проведен подбор экспрессионных штаммов-продуцентов, варьировались температура и длительность экспрессии. Очистку проводили методом металл-хелатной хроматографии с последующей гель-фильтрацией, чистота полученных препаратов составила более 95%. Было показано наличие ферментативной активности. Использование стадии ферментативной предобработки с помощью полученного рекомбинантного фермента позволило получить сдвиг пороговых циклов в модельных экспериментах в формате ПЦР в реальном времени на 3-4 цикла. В дальнейшем планируются эксперименты по детальной характеристике свойств рекомбинантного фермента.

БИОКАТАЛИЗАТОРЫ С ПОВЫШЕННОЙ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬЮ ДЛЯ ГИДРОЛИЗА КРАХМАЛА

Шаповалова О.Е., Дроздов А.С., Виноградов В.В.

Санкт-Петербургский государственный университет информационных технологий механики и оптики, 191002, Санкт-Петербург, улица Ломоносова, 9,
e-mail: mail.to.shapovalova@gmail.com

Амилазы (E.C.3.2.1.1) представляют собой ферменты, которые катализируют гидролиз внутренних 1,4-гликозидных связей в крахмале в низкомолекулярные продукты, такие как глюкоза, мальтоза и мальтотриозные единицы [1]. Среди всех существующих амилаз наибольший спрос имеет α-амилаза, которая широко используется для различных биотехнологических применений, таких как переработка крахмала, производство моющих средств, текстильная, бумажная и фармацевтическая промышленности [2]. Однако, несмотря на все преимущества, существует ряд ограничений при использовании данных ферментов. А именно, такие биокатализаторы имеют ограниченные рабочие температурный и pH диапазоны и чувствительны к химическим веществам. Также промышленная α-амилаза требует очистки и иммобилизации для повышения ее активности и возможности повторного использования, что является серьезной проблемой, поскольку все эти методы требуют сложного оборудования, которое является довольно дорогостоящим, а также существует высокая вероятность того, что фермент может потерять свою биологическую активность во время этого [3]. Поэтому выбор материала-носителя может оказать решающее влияние на стабильность и эффективность иммобилизации фермента.

Для решения проблем, описанных выше, был предложен способ создания композитов, обладающих α-амилазной активностью, состоящих из α-амилазы, магнетитовой или бемитовой керамической матрицы. Материал получали путем иммобилизации фермента в ксерогелевую матрицу в процессе золь-гель перехода при комнатной температуре. Для гибридных органо-неорганических композитов с массовой долей фермента до 10 масс. % не наблюдалось высвобождения биомолекул при инкубации в буферных растворах. Сравнительный анализ относительной ферментативной активности свободного фермента и полученных биокомпозитов показал их различное поведение в диапазоне температур от 40 до 90 °C. При 40 °C относительные активности свободной α-амилазы, биокомпозитов α-амилаза@магнетит, α-амилаза@бемит составили 73%, 50% и 72%, соответственно. При 90 °C относительная активность свободной α-амилазы снижалась до 23%, в то время как композиты α-амилаза@магнетит и α-амилаза@бемит сохраняли активность на уровне 66% и 85%, соответственно. Также был проведен анализ активности свободной и энтрапированной α-амилазы через 6 месяцев хранения при комнатной температуре. Было показано, что за это время свободный фермент, фермент, энтрапированный в магнетитовую матрицу и фермент, энтрапированный в бемитовую матрицу, потеряли 32%, 25% и 14% от своей первоначальной активности, соответственно.

В результате исследования были получены биокатализаторы с повышенной термостабильностью и увеличенным сроком хранения, которые можно использовать либо в качестве многоразового катализатора с магнитным разделением, либо в качестве каталитического керамического покрытия в реакторах периодического или проточного действия с не менее чем 8 циклами использования.

Литература
1. Rajagopalan G., Krishnan C. *Bioresource technology*, 2008, **99(8)**, 3044.
2. Paul J.S., Gupta N., Beliya E., Tiwari S., Jadhav S.K. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021, **193(8)**, 2649.
3. Souza P.M., Magalhães P.O. *Brazilian journal of microbiology*, 2010, **44**, 850.

КЛОНИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ РИБОНУКЛЕОЗИДГИДРОЛАЗЫ С ИЗ БАКТЕРИЙ *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI*, СИНТЕЗИРУЮЩЕЙСЯ В ОТВЕТ НА ПАТОГЕН *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Шапошников Л.А.[1,2], Чикурова Н.Ю.[1,2], Атрошенко Д.Л.[1,2], Савин С.С.[1,2], Тишков В.И.[1,2], Пометун А.А.[1,2]

[1]ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия.
[2]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия,
E-mail: shaposhnikovleo@gmail.com

Больничные инфекции в настоящее время являются серьёзной проблемой, поскольку обычно имеют повышенную устойчивость к антибиотикам. Одними из наиболее серьёзных патогенов являются бактерии рода *Klebsiella*. Эти бактерии вызывают пневмонию, воспаление мочеиспускательной системы, проблемы с печенью и почками. Известно, что при обработке антибиотиками эти бактерии переходят в состояние биоплёнки, в котором они очень устойчивы, поэтому актуальным является поиск способов борьбы с биоплёнками. При проведении совместного культивирования бактерий рода *Lactobacillus* и бактерий рода *Klebsiella* оказалось, что существует два штамма лактобактерий, которые препятствуют росту *Klebsiella* и разрушают их. Этими штаммами являются *L. reuteri* LR1 и *L. rhamnosus* F. Эти штаммы особо интересны потому, что они являются компонентами нормальной микрофлоры кишечника человека. Был проведён протеомный анализ при совместном культивировании *L. reuteri* и *Klebsiella,* и оказалось, что в ответ на клебсиеллы в лактобактериях синтезируется ряд новых белков, которые условно можно разделить на три категории: гидролазы клеточной стенки, гидролазы нуклеиновых кислот и ферменты метаболизма. Для изучения была выбрана гидролаза нуклеиновых кислот рибонуклеозидгидролаза C (RihC).

RihC относится к семейству рибонуклеозидгидролаз Rih, является неспецифической гидролазой, катализирует реакцию расщепления рибонуклеозидов до азотистых оснований и рибозы. Данный фермент синтезируется в *L. reuteri* в больших количествах при культивировании *L. reuteri* + *K. pneumoniae* и в меньшем количестве при тройном культивировании (*L. reuteri* + *L. rhamnosus* + *K. pneumoniae*).

Целью данной работы было получение плазмид, содержащих ген выбранного фермента из *L. reuteri* с различным расположением гистага (His-tag), необходимого для очистки методом металл-хелатной хроматографии, экспрессии ферментов, их очистке и изучении кинетики расщепления нуклеозидов.

Для RihC была проведена экспрессия в клетках *E. coli* двух вариантов фермента, выяснено, что вариант с гистагом на N-конце синтезируется примерно в три раза больше, чем вариант с гистагом на C-конце. Для обеих форм были изучены кинетические свойства в реакции с разными субстратами и выяснено, что фермент с гистагом на N-конце имеет лучшие кинетические параметры из двух форм (K_M для обеих форм фермента примерно одинаковы, но k_{cat} примерно в 1,5-2 раза выше по сравнению с формой с гистагом на C-конце для всех субстратов).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда. Грант № 23-64-10029.

ДОБАВЛЕНИЕ ИОН-ПАРНЫХ РЕАГЕНТОВ УЛУЧШАЕТ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ АМИНОСОЕДИНЕНИЙ ПОСЛЕ ПРЕДКОЛОНОЧНОЙ МОДИФИКАЦИИ О-ФТАЛЕВЫМ АЛЬДЕГИДОМ И ХИРАЛЬНЫМ ТИОЛОМ

Пирогов И.В.[1], Панин Н.В.[1], Гуранда Д.Ф.[1], Швядас В.К.[1,2]

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40.
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73.
Авторы, ответственные за переписку: vytas@belozersky.msu.ru; ikaesovich@mail.ru

Пенициллинацилаза (ПА) успешно применяется для стереоселективного синтеза N-ацилированных производных цистеина – хиральных дериватизирующих агентов (ХДА) для ВЭЖХ. С помощью ПА был получен ряд новых хиральных тиолов и показана возможность их применения для анализа широкого круга энантиомеров аминосоединений – аминокислот, первичных аминов и аминоспиртов. Шесть SH-соединений оказались более эффективными ХДА, чем традиционный N-ацетил цистеин (NAC). Однако не для всех энантиомеров удается добиться хорошего хроматографического разрешения, которое зависит от внутримолекулярных взаимодействий между структурой хирального тиола и анализируемого аминосоединения. Потенциал ПА для получения ранее неизвестных ХДА может быть увеличен за счет использования новых ацильных доноров, например, хлорацетамида с последующим химическим замещением галогена на тиольную группу. Полученные таким образом ХДА показали высокую эффективность на некоторых «трудных» энантиомерах.

Наряду с созданием новых ХДА перспективным подходом для улучшения эффективности хирального ВЭЖХ анализа аминосоединений представляется физико-химическая инженерия аналитической системы. Так, например, повышение температуры приводит к более эффективному разделению диастереомеров. Дополнительные возможности представляет также использование ион-парных реагентов, применяемых в обращенно-фазовой ВЭЖХ для более эффективного разделения структурных аналогов. Использование солей четвертичного аммония (положительный заряд) с различными алифатическими радикалами приводит к существенному улучшению разделения аминокислот (отрицательный заряд) после предколоночной модификации не только различными ХДА, но и традиционным NAC. При добавлении тетрабутиламмония (ТБА) в подвижную фазу ВЭЖХ наблюдается улучшение хроматографического разделения диастереомеров фенилаланина и хорошее разделение ($Rs > 1.5$) неразделяемого при использовании NAC лейцина, глутамата. С помощью триметилоктиламмония можно улучшить разрешение аспартата не разделяемого с NAC даже в присутствии ТБА. Таким образом обнаружено, что применение ион-парных реагентов существенно расширяет возможности хирального анализа аминокислот. Эта дополнительная степень свободы, в сочетании с высоким биокаталитическим потенциалом ПА для синтеза новых хиральных тиолов, может быть использована при решении наиболее трудных аналитических задач по определению отдельных энантиомеров аминосоединений.

АПРОБАЦИЯ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО ВЕБ-СЕРВЕРА *YOSSHI* НА ПРИМЕРЕ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ *E.COLI:* ПРОБЛЕМЫ КОПИРОВАНИЯ ХАРАКТЕРНЫХ ДЛЯ СУПЕРСЕМЕЙСТВА S-S МОСТИКОВ

Панина А.М.[1], Панин Н.В.[1], Суплатов Д.А.[1], Швядас В.К.[1,2]

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40.
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73.
Авторы, ответственные за переписку: vytas@belozersky.msu.ru; panin@belozersky.msu.ru

Ранее разработанная методология биоинформатического поиска дисульфидных мостиков, характерных для суперсемейств белков [1,2], была использована для выявления соответствующих дисульфидных мостиков в Ntn-гидролазах с целью изучения возможностей их введения в структуру пенициллинацилазы из *Escherichia coli,* принадлежащей этому суперсемейству, чтобы таким путем добиться более высокой стабильности фермента и изменения его функциональных свойств. Для этой цели был проведен биоинформатический анализ всех известных аминокислотных последовательностей в суперсемействе Ntn-гидролаз (628 последовательностей) и определено 235 дисульфидных мостиков, которые потенциально могли быть включены в структуру пенициллинацилазы. Проведение структурной фильтрации, применяемой на третьем этапе алгоритма *yosshi*, сократило это число до 11, и позволило выделить подходящие для введения дисульфидные мостики с наиболее высоким приоритетом: ранее неизвестный S-S мостик в позиции β307-β320, а также мостик β500-β533, содержащийся в структуре термостабильной пенициллинацилазы *A.faecalis*, и β150-β173, встречающийся у ферментов галофилов. Проведенная экспериментальная проверка стабильности и каталитических свойств полученных мутантов показала, что при введении мутаций bT307C+bV320C не наблюдается формирование дисульфидного мостика (или этот процесс происходит чрезвычайно медленно), что, соответственно, не приводит к изменению каталитической активности и термостабильности фермента. По-видимому это связано с недостаточно близким расстоянием между введенными аминокислотными остатками цистеина. Хотя расстояния в модельной структуре между Cα и Cβ – 7.4 Å и 4.6 Å указывают на статистическую возможность формирования мостика (3σ), кинетика его образования мостика может быть медленной, тем более, что в ближайшем микроокружении находится электрофильный остаток βR317. Мутация βW500C+βR533C не оказала существенного влияния на каталитическую активность пенициллинацилазы и привела к снижению термостабильности по сравнению с нативным ферментом в 2 раза, что, вероятно, вызвано потерей электростатического взаимодействия βR533 с остатком βD280 на соседней альфа-спирали. Мутантная форма βS150C+βN173C экспериментально не была получена, поскольку визуальный анализ указал на возможную потерю 9 нековалентных взаимодействий, которые не может компенсировать одна ковалентная S-S связь, что было подтверждено сравнительной молекулярной динамикой природного фермента и мутантной формы. Проведенные исследования показали, что для предсказания стабилизирующих дисульфидных мостиков с помощью веб-сервера *yosshi* требуется применение более жесткого геометрического критерия, оценка влияния микроокружения образуемой S-S связи, а также учет теряемых при этом нековалентных взаимодействий.

Литература

1. Suplatov D.A., Timonina D.S., Sharapova Y.A., Švedas V.K. (2019) Yosshi: a web-server for disulfide engineering by bioinformatic analysis of diverse protein families. *Nucleic Acids Res.*, 47(W1), W308–W314. DOI:10.1093/nar/gkz385
2. https://biokinet.belozersky.msu.ru/yosshi

РАЗВИТИЕ ХЕМОЭНЗИМАТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ: БЕТА-ЛАКТАМНЫЕ ТИОАМИДИНЫ

Панин Н.В.[1], Тюрин Е.С. [1], Никулин М.В. [1], Нилов Д.К. [1], Швядас В.К. [1,2]

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40.
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженериии биоинформатики, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73.
Авторы, ответственные за переписку: vytas@belozersky.msu.ru; panin@belozersky.msu.ru

Пенициллинацилаза (ПА) *E.coli* обладает высоким каталитическим потенциалом в реакции N-бромацетилирования цефалоспориновых и пенициллиновых ядер. Полученные продукты могут служить платформой для получения библиотеки новых бета-лактамных антибиотиков: перспективным направлением является замена атома подвижного галогена в результате химической конденсации с производными тиомочевины в соответствии с принципами клик-химии. В настоящей работе был синтезирован ряд бета-лактамных тиоамидинов и изучены их антибактериальные свойства. Выбор подходящих производных тиомочевины был осуществлен при помощи ковалентного докинга, чтобы оценить эффективность взаимодействия получаемых тиоамидинов с одной из потенциальных мишеней их действия – транспептидазой *PBP1b,* ответственной за строительство пептидогликана в *E.coli.* В результате докинга и визуального анализа было отобрано двенадцать структур для экспериментального получения соответствующих тиоамидинов и проверки их свойств. Для этого отобранные производные тиомочевины смешивали с бромацетилированными ядрами 7-АЦК и 7-АДЦК. При использовании дизамещенных производных реакция проходила быстро и количественно, в случае монозамещенных потребовалась оптимизация в кинетически контролируемом режиме. Таким образом были синтезированы 24 ранее неизвестных цефалоспориновых тиоамидина, их структура и чистота подтверждены с помощью масс-спектрометрии и ВЭЖХ. Проверка антибактериальных свойств полученных соединений по отношению к условному патогену *E.coli* TG-1 показала, что наиболее высокой антибиотической активностью обладали (в скобках приводится минимальная действующая концентрация антибиотика): цефатиамидин (50 мкг/мл) = 1-бензил-3-метил-2-тиомочевина-7-АЦК (60 мкг/мл) > N-этилтиомочевина-7-АЦК (90 мкг/мл) > 1-бис-(2-гидроксиэтил)-3-фенил-2-тиомочевина-7-АЦК (130 мкг/мл) > 1-этил-3-(3,4-ксилил)-2-тиомочевина-7-АЦК (200 мкг/мл) > Фенилтиогидантоин L-серина-7-АЦК (280 мкг/мл) > N-(α-нафтил)-тиомочевина-7-АЦК (400 мкг/мл). При изучении антибиотической активности к штамму BL-21b (с геном бета-лактамазы, определяющей устойчивость к ампициллину) обнаружено, что этилтиомочевина-7-АЦК вплоть до концентрации 90 мкг/мл в первые сутки не дает зарастания в отличие от аптечных антибиотиков пенициллина, ампициллина и цефатиамидина. Таким образом, с использованием ПА могут быть получены ранее неизвестные бета-лактамные тиоамидины, обладающие антибактериальной активностью, в том числе устойчивые к действию бета-лактамаз.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 17-74-10255

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ И ОПТИМИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО СИНТЕЗА N-БРОМАЦЕТИЛИРОВАННЫХ БЕТА-ЛАКТАМОВ С ПОМОЩЬЮ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ *E.COLI*

Панин Н.В.[1], Тюрин Е.С.[1], Никулин М.В.[1], Дробот В.В.[1], Кириллин Е.М.[1], Швядас В.К.[1,2]

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40.
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73.
Авторы, ответственные за переписку: vytas@belozersky.msu.ru; panin@belozersky.msu.ru

Пенициллинацилаза (ПА) – эффективный катализатор ацилирования аминосоединений. Широкая субстратная специфичность фермента по отношению к аминосоединениям определяет биотехнологический потенциал фермента, который до последнего времени ограничивался промышленным получением таких бета-лактамных антибиотиков как ампициллин, амоксициллин и цефалексин. В то же время перспективы дальнейшего практического использования ПА связаны с расширением круга ацильных доноров, содержащих подвижный атом галогена, что предоставляет возможности последующего химического замещения. Проведенные исследования показали способность пенициллинацилазы из *Escherichia coli* использовать галоген-замещенные ацетамиды в качестве ацильных доноров при ацилировании бета-лактамных ядер (6-аминопенициллановой, 7-аминоцефалоспорановой и 7-аминодезацетоксицефалоспорановой кислот), однако фермент при этом может подвергаться необратимой инактивации в результате ковалентной модификации N-концевого серина. Обнаружено, что наиболее перспективным ацильным донором является бромацетамид, при использовании которого вклад инактивации фермента может быть уменьшен при понижении температуры. Установлено также, что при использовании бромацетамида в качестве ацильного донора в реакциях, катализируемых пенициллинацилазой из *Escherichia coli,* наблюдается более высокая нуклеофильная реакционная способность цефалоспориновых ядер (7-АЦК и 7-АДЦК) по сравнению с ферментативным ацилированием ядра пенициллинов 6-АПК при синтезе ампициллина. При исследовании возможностей улучшения эффективности ферментативного ацилирования ядер бета-лактамных антибиотиков с использованием бромацетамида в качестве ацильного донора в результате так называемой инженерии биокатализа (biocatalysis engineering) обнаружено, что эффективность процесса может быть улучшена как за счет инженерии среды проведения реакции, так и инженерии самого фермента. Полученные результаты свидетельствуют о возможности расширения биокаталитического потенциала пенициллинацилазы *E.coli* для синтеза бромацетилированных бета-лактамов – основы для создания линейки новых потенциальных антибиотиков.

ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ: СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЯ

Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Тихонова Т.В., Попов В.О.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук,
119071, Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2
e-mail: shipkov1995@yandex.ru

Тиоцианатдегидрогеназа – фермент, катализирующий разложение тиоцианата с образованием цианата, молекулярной серы и переносом двух электронов на внешний акцептор. Тиоцианатдегидрогеназа была впервые выделена из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* (tpTcDH) и охарактеризована в лаборатории инженерной энзимологии ФИЦ Биотехнологии РАН, в частности, изучены ферментативные свойства, влияние ионов меди и получена трехмерная структура фермента [1]. Показано, что активный центр tpTcDH содержит 3 иона меди, которые принимают участие в связывании субстрата и катализе. За структурную организацию активного центра отвечают 10 аминокислотных остатков, которые координируют ионы меди и принимают участие в катализе. Было предположено, что шаблон, состоящий из этих 10 аминокислотных остатков, отвечает за принадлежность белка к тиоцианатдегидрогеназам. Это предположение было подтверждено на гомологах tpTcDH из бактерий *Hydrogenophilales bacterium* SM250 (65% гомологии) и из *Thiohalobacter thiocyanaticus* (30% гомологии). Оба белка содержали 3 иона меди на молекулу фермента и обладали тиоцианатдегидрогеназной активностью. Всего обнаружено больше 50 гомологов tpTcDH в различных бактериях. При множественном выравнивании обнаружено, что большинство гомологов содержит шаблон из 10 аминокислотных остатков без изменений. Но в ряде гомологов tpTcDH остаток His482, который координирует ион Cu3, заменен на Gln или Glu. Такие гомологи представляют интерес, так как мутанты H482Q tpTcDH не обладают ферментативной активностью и в них отсутствует ион Cu3. Для исследования был выбран гомолог tpTcDH из *Tautonia sociabilis* (tsTcDH), содержащий замену H482Q. Белок был получен с помощью гетерологичной экспрессии в *E. coli* BL21(DE3). Весь белок находился в телах включения, однако, с помощью экспрессии в присутствии белков-шаперонов и модификации способа выделения и очистки удалось получить растворимый препарат белка. Полученный белок представлял собой димер, как и tpTcDH. На полученном препарате tsTcDH было изучено влияние ионов меди и охарактеризованы ферментативные свойства. Получение трехмерной структуры tsTcDH – одна из ближайших целей, это позволит уточнить функции отдельных ионов меди каталитического кластера, механизм действия и роль TcDH в клетке.

Литература
1. Tikhonova T.V. et al. Trinuclear copper biocatalytic center forms an active site of thiocyanate dehydrogenase // Proc. Natl. Acad. Sci. 2020. Vol. 117, № 10. P. 5280–5290.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, грант № 23-74-30004

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОЗИМОВ «ИСКУССТВЕННАЯ ПЕРОКСИДАЗА» НА ОСНОВЕ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ

Шнейдерман А.А., Комкова М.А., Карякин А.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119234, Москва, ул. Ленинские Горы, 1к3
e-mail: aleshneiderman@gmail.com

Фермент пероксидаза широко применяется в медицине и биотехнологии, однако строгие требования к хранению и использованию биокатализатора делают перспективным создание его неорганических аналогов, или нанозимов. Среди нанозимов «искусственная пероксидаза» наиболее эффективными являются наночастицы на основе берлинской лазури (БЛ), синтезированные в ходе реакции активации пероксида водорода (каталитически). За счет большого числа активных центров, вовлеченных в каталитическую реакцию, а также отсутствия влияния ориентации на диффузионно-контролируемые процессы такие наночастицы имеют высокую каталитическую активность. Однако фундаментальные пределы эффективности катализа нанозимами на основе БЛ ранее не были изучены.

С использованием подходов стационарной ферментативной кинетики исследована кинетика реакции восстановления пероксида водорода, катализируемой нанозимами, в присутствии субстратов с различными восстановительными потенциалами: 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, пирокатехина и желтой кровяной соли ($E^{0'}(S_{Ox}/S_{Red})$ = 0.50, 0.36, 0.21 В относительно ХСЭ соответственно). Установлено, что значение константы скорость-лимитирующей стадии каталитического цикла (необратимой бимолекулярной реакции взаимодействия комплекса нанозима и восстанавливающего субстрата с пероксидом водорода, k_2) растёт с уменьшением редокс-потенциала субстрата. Также рассчитанные согласно уравнению Аррениуса энергии активации катализируемой нанозимами реакции тем выше, чем выше редокс-потенциал субстрата. При этом полученные значения значительно ниже, чем для известных в литературе нанозимов, а в сравнении с наиболее изученными нанозимами Fe_3O_4 – до 5 раз ниже.

Исследована кинетика реакции восстановления пероксида водорода при катализе нанозимами разного размера от 30 до 360 нм. Зависимость k_2 от размера наночастицы линеаризуется в билогарифмических координатах с тангенсом угла наклона близким к 3. Это указывает на вовлечение в каталитическую реакцию активных центров как на поверхности, так и в объеме наночастиц. Так, для нанозимов с диаметром около 300 нм полученные значения k_2 на 3-4 порядка величины превосходят константы для ферментов пероксидаз для стадии их взаимодействия с пероксидом водорода (наиболее быстрой стадии) и на 4-5 порядков – константы скорость-лимитирующей стадии действия фермента.

Благодаря высокой каталитической активности и низкой цитотоксичности БЛ может быть использована в качестве препарата для подавления активных форм кислорода (АФК). Так, была проведена инкубация клеток макрофагов RAW 264.7 в течение 3 часов в питательной среде, содержащей нанозимы. Методом проточной цитометрии с детекцией флуоресценции было показано, что уже 10 мкг/мл препарата позволяет на 65% снизить содержание АФК в клетках. При этом наблюдаемый эффект тем выше, чем выше была концентрация БЛ при инкубации.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 21-73-10123.

ДИНАМИКА УРОВНЕЙ ОСНОВНЫХ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ В ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ОТВЕТ НА КОРОТКИЙ ЗРИТЕЛЬНЫЙ СТИМУЛ

Яковлев А.Н.[1,2,3], Грицкова А.В.[1], Ублинский М.В.[1,2], А. Манжурцев А.В.[1,2,4], Ахадов Т.А.[1,4], Семенова Н.А.[1,2,3,4]

[1]Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии, 119191, ул. Большая Полянка, 22
[2]Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119334, ул. Косыгина, 4
[3]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, ул. Косыгина, 4
Email: yakovlevalekcej@bk.ru

Глутамат (Glu) и γ-аминомасляная кислота (ГАМК) являются основными нейромедиаторами (возбуждающим и тормозным, соответственно) в головном мозге человека. При помощи магнитно-резонансной спектроскопии можно неинвазивно измерить уровни этих нейромедиаторов. Однако существует предположение[1], что видимый МРС-сигнал отражает лишь свободные нейромедиаторы, то есть не находящиеся, например, в везикулах. Учитывая низкую скорость метаболизма на временных промежутках меньше минуты, наблюдаемые быстрые изменения уровней нейромедиаторов таким образом можно отнести к выбросу из везикул. В данной работе оценивается изменение уровней нейромедиаторов в ответ на короткий зрительный стимул при помощи протонной МРС.

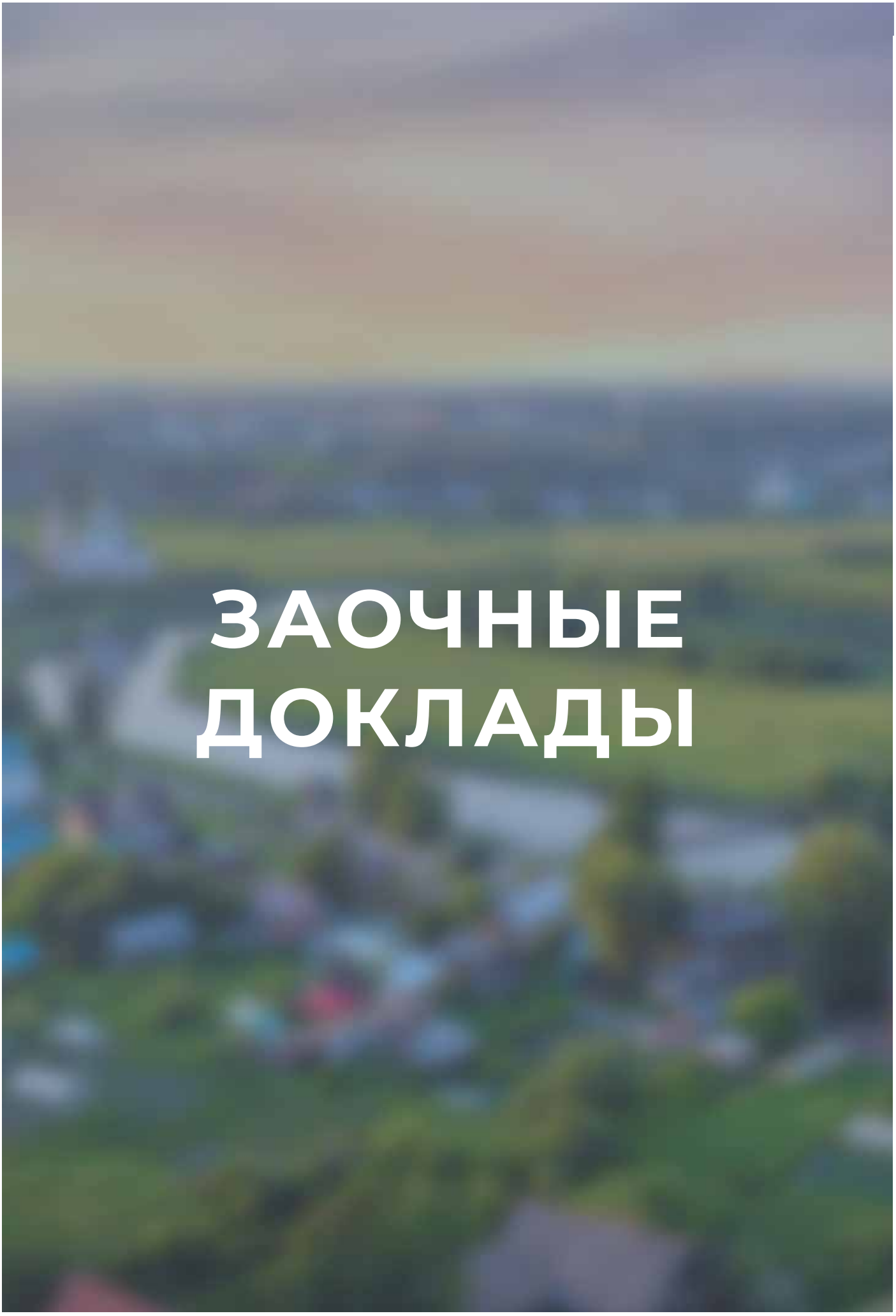
Все данные МРТ и протонной МРС получены на томографе Philips Achieva dStream 3T. В исследовании приняло участие 33 и 25 здоровых волонтера для измерения GABA и Glu, соответственно. Для зрительной активации использовалась мерцающая с частотой 8 Гц шахматная доска в блоках (3с - стимуляция, 13.5/21s – черный экран (GABA/Glx); 15 раз для фМРТ и 40 - МРС). ФМРТ-изображения получены при помощи GE EPI со следующими параметрами TR/TE = 3000/40 мс, угол отклонения = 90°, разрешение = 2.4×2.4 мм, толщина среза = 4 мм, число срезов = 30 (83 накопления). Спектры для измерения GABA получены при помощи импульсной последовательности MEGA-PRESS (TR/TE = 1500/68мс, NSA = 802, 30x40x25мм), для Glx – PRESS (TR/TE = 2000/35мс, NSA = 432, 20x30x20мм) и локализованы в активированной области зрительной коры. Ширина линии и высота сигналов метаболитов определена из аппроксимации резонансных линий Cr (3 м.д.) и NAA (2 м.д.). Количественная обработка спектров выполнена при помощи LCmodel.

Апостериорный тест Даннета выявил статистически значимые изменения ширины линии и высот резонансных линий Cr и NAA. Ширины линий этих метаболитов уменьшаются, а высоты – увеличиваются, причем максимальное изменение наблюдается на 6-ой секунде. Наблюдается статистически значимое увеличение Glx (Glu+Gln) на 1-ой и 15-ой секундах и ГАМК на 1,5-3с после начала предъявления стимуляции.

Наше исследование демонстрирует применимость протонной МРС для измерения BOLD-ответа, в том числе и его временных характеристик, в группе испытуемых. По изменениям уровней нейромедиаторов в первые секунды после стимула можно непосредственно оценить возбуждение и торможение в зрительной коре в ответ на какой-либо стимул.

Литература

[1] R. A. Kauppinen, T. R. M. Pirttila, S. O. K. Auriola, и S. R. Williams, *Biochem. J.*, 1994, т. **298**, вып. 1.



ЗАОЧНЫЕ ДОКЛАДЫ

ОСОБЕННОСТИ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Багрянцева О.В., Гурэу З.Г., Гмошинский И.В., Селезнева Т.

ФГБУН «Федеральный исследовательский цента питания, биотехнологии и безопасности пищи», 109240, Москва, Устьинский проезд, 2/14

В настоящее время в пищевой промышленности широко используются ферментные препараты (ФП) в качестве катализаторов биохимических процессов при переработке и изготовлении пищевой продукции, что обусловливает необходимость контроля безопасности производственных штаммов микроорганизмов и наличия в ФП загрязнителей. К таким загрязнителям относятся живые клетки и /или ДНК штамма-продуцента, векторные последовательности и/или внехромосомные элементы (плазмид, транспозонов, бактериофагов и др.) штаммов-продуцентов, определяющие их степень патогенности и вирулентности, токсины бактерий или микотоксины, антибиотики. Наличие этих загрязнителей в составе ФП может привести к повышению антибиотикорезистентности и вирулентности микроорганизмов, входящих в состав микробиоценоза кишечника. Наличие в составе ферментов бактериальных токсинов или микотоксинов может явиться причиной их токсического действия на организм.

Оценка рисков для человека этих загрязнителей ФП показала необходимость, в первую очередь, проведения исследований штамма-продуцента: определение его видовой принадлежности, патогенности, способности к диссеминации внутренних органов, аллергенности, определение способности к продукции метаболитов, оказывающих негативное воздействие на организм (токсинов, антибиотиков и др.), наличие детерминант антибиотикоустойчивости, анализ последовательности генома, для ГММ - характеристика штамма реципиента и штамма донора, для мутантных штаммов – описание мутации. С целью соблюдения принципа «один штамм - один продукт» штамму, прошедшему процедуру оценки рисков, должен быть присвоен индивидуальный код-номер [1-3].

Оценка возможного негативного действия ферментов в условиях *in vitro* (с использованием культур клеток) определяет их способность вызывать хромосомные аберрации, наличие антибиотической активности, мутагенности, генотоксичности, эмбриотоксичности, гепатотоксичности, нейротоксичности. Оценка ФП в условиях *in vivo* в остром эксперименте на животных включает определение среднелетальной дозы. В подостром эксперименте в течение 90 дней проводятся исследования физиологических показателей, когнитивной функции, определение массы тела и внутренних органов, биохимические и гематологические показатели крови, апоптоз клеток, аллергенность, иммунотоксичность, влияние на кишечный микробиом [1-3]. В целях стандартизации этих экспериментов в качестве единицы, определяющей дозу фермента, используют количество органических веществ (TOS) на кг массы тела экспериментального животного [3].

Литература

1. Багрянцева О.В., Гмошинский И.В., Шипелин В.А., с соавт. Оценка рисков ферментного препарата – комплекса глюкоамилазы и ксиланазы из Aspergillus awamori Xyl T-15. // Вопросы питания. 2021. Т. 90, № 3.С. 28-39, doi:10.33029/0042-8833-2021-90-3-00-00

2.Багрянцева О.В., Гмошинский И.В., Шипелин В.А., с соавт. Оценка влияния ферментного препарата -комплекса глюкоамилазы и ксиланазы из Aspergillus awamori xyl t-15 на микробиом кишечника и иммунологические показатели крыс//Вопросы питания. 2022. Т. 91. № 3 (541). С. 42-52, doi.org/10.33029/0042-8833-2022-91-3-00-00

3.Lambr C., Baviera J.M/B, Bolognesi C. et al. Scientific Guidance for the submission of dossiers on Food Enzymes//EFSA Journal 2021;19(10):6851, doi: 10.2903/j.efsa.2021.6851

Работа по подготовке рукописи проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания (Тема РАН №0410-2022-0003).

ОПТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОННОГО ПУЧКА НА СВОЙСТВА ФЕРМЕНТА

Иванов Ю.Д.,[а,б] Шумов И.Д.,[а] Козлов А.Ф.,[а] Будник С.В.,[в] Чурюкин Р.С.,[в] Зиборов В.С.,[а,б] Арчаков А.И.[а]

[а] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10 стр. 8, e-mail: yurii.ivanov.nata@gmail.com

[б] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Объединенный институт высоких температур Российской академии наук (ОИВТ РАН), г. Москва, ул. Ижорская, д.13, стр.2.

[в] MBA, CIMA(PM),

Было проведено исследование влияния облучения образца фермента пероксидазы хрена (ПХ) пучком электронов на свойства этого фермента в диапазоне доз облучения от 0 до 40 кГр. Методом спектрофотометрии определяли активность фермента по отношению к его субстрату - диаммониевой соли 2,2’-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты) - в буферном растворе после его облучения.

Водный раствор ПХ с концентрацией фермента 0,1 мкМ в 2 мМ фосфатно-солевом буферном растворе (pH 7,4) помещали в стандартную полипропиленовую микропробирку и облучали пучком электронов с энергией 9,7 МэВ. Микропробирку с контрольным образцом раствора ПХ располагали в экранированной комнате на расстоянии 50 м от экспериментальной установки, но в этом же здании. Было показано, что ферментативная активность ПХ снижалась с увеличением дозы облучения, и полностью исчезала при дозе облучения 40 кГр.

Полученные результаты необходимо учитывать при разработке биотехнологических установок и устройств, использующих электронные пучки для стерилизации продуктов питания и других целей. Также полученные данные важны при анализе возможных патологических факторов, возникающих при воздействии электронных пучков на живые организмы.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№122030100168-2).

ЗАВИСИМОСТЬ СТЕПЕНИ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ВЫХОДА РЕДУЦИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ОТ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ МИСКАНТУСА

Кащеева Е.И., Гладышева Е.К., Гисматулина Ю.А., Будаева В.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, 659322, Россия, Алтайский край, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1, massl@mail.ru

Мискантус гигантский – многолетняя энергетическая (быстрорастущая) техническая культура с высоким приростом биомассы, зарекомендовавшая себя как перспективное сырье для получения продуктов химической и биотехнологической трансформации [1-3]. Целью данной работы являлось исследование ферментативного гидролиза образца целлюлозы мискантуса гигантского, а именно зависимость степени полимеризации (СП) целлюлозы и выхода редуцирующих веществ (РВ) от продолжительности процесса.

Образец целлюлозы для ферментативного гидролиза был получен из мискантуса сорта КАМИС (ООО «Мастер Брэнд», г. Москва) последовательной обработкой сырья разбавленными растворами азотной кислоты и гидроксида натрия. Работа выполнена при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск). Показатели качества целлюлозы: массовая доля (м.д.) α-целлюлозы 95,6 %, м.д. кислотонерастворимого лигнина 0,5 %, м.д. золы 0,10 %, м.д. пентозанов 2,5 %, СП целлюлозы 1770. Ферментативный гидролиз проводился согласно методике [4] при начальной концентрации субстрата 45 г/л в течение 48 ч.

Таблица 1. Зависимость степени полимеризации целлюлозы и выхода редуцирующих веществ от продолжительности ферментативного гидролиза образца целлюлозы мискантуса

Продолжительность гидролиза, ч	СП	Выход редуцирующих веществ, %
2	1490	24
4	1620	33
6	1640	37
8	1640	41
24	1750	44
32	1780	49
48	1790	52

В результате установлено, что при продолжительности гидролиза в интервале 2-48 ч выход РВ увеличивается с 24 % до 52 %. При этом СП в первые 2 ч гидролиза резко снижается с 1770 до 1490, а затем медленно возрастает в течение всего процесса до достижения СП 1790, близкой к первоначальной. Эти данные необходимы для разработки способа одновременного получения целлюлозы в качестве прекурсора нитратов целлюлозы с регулируемой вязкостью и питательной среды для микробиологического синтеза.

Литература:
1. Gismatulina Y.A. et all. Plants, 2022, 11, 2791. https://doi.org/10.3390/plants11202791
2. Babich O. et al. *Foods and Raw Materials*, 2019, 7(2), 403-411. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-403-411
3. van der Cruijsen K. et al. *Molecules*, 2021, 26, 254. https://doi.org/10.3390/molecules260202
4. Kashcheyeva E.I. et al. *Polymers*, 2019, 11(10), 1645. https://doi:10.3390/polym11101645

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, https://rscf.ru/project/22-13-00107/

ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ОБМЕНА ЭНДОГЕННОГО ЭТАНОЛА В ОРГАНИЗМАХ СЕВЕРНЫХ ЖИВОТНЫХ, ВКЛЮЧАЯ ЗИМОСПЯЩИХ, – МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ К ЭКСТРЕМАЛЬНО НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ

Кершенгольц Б.М., Колосова О.Н.

Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской Академии Наук.
677980, г.Якутск, просп. Ленина, 41.
kerschen@mail.ru

Наиболее стрессирующий фактор для организмов высших позвоночных в условиях Севера - холод. В этих условиях особое значение приобретают «древнейшие» дегидрогеназные ферментативные системы, позволяющие, во-первых, генерировать энергию при окислении простейших субстратов даже при недостатке кислорода. Во-вторых, синтезировать *in vivo* триггеры разобщения окислительного фосфорелирования для увеличения генерации тепловой энергии и модификаторы активности специфичных пептидных регуляторов. В организме холодоадаптированных мелких (полевки) и крупных аборигенных (якутская лошадь, северный олень), а также зимоспящих (якутский длиннохвостый суслик) животных Севера изучено содержание эндогенных этанола (ЭЭ) и ацетальдегида (ЭА), каталитические параметры ферментов их метаболизирующих (алкогольдегидрогеназы - АДГ и альдегиддегидрогеназы – АльДГ) в сезоны с максимальными температурными различиями (зима, лето). Установлено, что в организмах холоадаптированных НЕзимоспящих животных происходит синхронное повышение концентраций ЭЭ и ЭА зимой, вызывающее физиолого-биохимические адаптивные перестройки, повышающие устойчивость организма к холоду. Сезонная динамика содержания ЭЭ и ЭА в крови зимоспящих животных имеет асинхронный характер: соотношение [ЭА]/[ЭЭ] увеличивается в период зимней спячки, по сравнению с активным летним состоянием, более чем в 15 раз. Причем во всех физиологических состояниях зимоспящих абсолютные уровни ЭЭ и ЭА существенно выше, чем у незимоспящих животных (кроме уровня ЭЭ зимой). Эти изменения указывают на специфическую роль данных метаболитов в механизмах снижения уровня обмена веществ в состоянии спячки (особенно ЭА) и его резкого повышения в активном состоянии летом (особенно ЭЭ). Отмеченные асинхронные сезонные изменения уровней ЭЭ и ЭА обусловлены изменением сродства АДГ и АльДГ к этим метаболитам: летом в 184 раза выше к ЭА чем к ЭЭ; зимой – в 50 раз выше к ЭЭ, чем к ЭА. Механизм изменения сродства АДГ и АльДГ к субстратам - сезонные различия изоферментных спектров этих ферментов: в состоянии гибернации - появление изоформ АДГ специфичных для зимней спячки ($АДГ_{IV}$) и «зимних» изоформ АльДГ; для активного состояния - АДГV и «летних» изоформ АльДГ. В итоге, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что сопряженные метаболиты – ЭЭ и ЭА, соотношение концентраций которых регулируется сезонно зависимой фенотипической структурой АДГ и АльДГ, обусловленной сезонными изменениями экспрессии соответствующих локусов и аллелей, образуют одну из систем регуляции интенсивности метаболизма в организме холодоадаптированных как НЕзимоспящих, так и зимоспящих животных: альдегидзависимая регуляция приводит к снижению уровня основного обмена; этанолзависимая - к активации биоэнергетических реакций. Функционирование этой регуляторной системы повышает устойчивость организмов к стрессирующему воздействию холода. В эксперименте с лабораторными холодоНЕадаптированными животными показано, что модификация «пептидов спячки», выделенных из тканей холодоадаптированных животных, микромолярными концентрациями ацетальдегида приводит к обратимому физиологичному снижению температуры тела на 8±2°С на 40-60 минут. Это открывает перспективы создания обратимых физиологичных гипобиотических состояний в организме человека, актуальных при проведении нейрохирургических кардиологических операций.

Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки России по проекту «Физиолого-биохимические механизмы адаптации растений, животных, человека к условиям Арктики/Субарктики …» (код научной темы: FWRS-2021-0025; № гос.регистрации в ЕГИСУ: АААА-А21-121012190035-9), а также с использованием оборудования ЦКП ФИЦ «ЯНЦ СО РАН»

ПАПАИН КАК АКТИВНЫЙ КОМПОНЕНТ В СОСТАВЕ БИОГЕЛЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ ИОНЫ СЕРЕБРА

Кондратьева Е.Г.,[а] Фидоровская Ю.С.,[б] Синицын А.П.[с]

[а]Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2, elgenkon@inbox.ru
[б]ООО «Колетекс», 115093, Москва, ул.Павловская, д.21, н/п 4-6
[с]МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, кафедра Химической энзимологии, 119991, Москва, Ленинские Горы, д.1, стр. 11Б, ГСП-1

Природные свойства альгината натрия позволяют формировать гели с включенными добавочными компонентами, усиливающими их антибактериальные и антимикробные характеристики для последующего применения в лечебных целях. В качестве дополнительного усилителя антибактериального и антимикробного действия в композитной биогелевой матрице были использованы совместно растительная протеаза папаин и ионы серебра Ag+. Ионы серебра, обладая антимикробными свойствами, являются одновременно ингибиторами ферментов. Экспериментально подтверждена оптимальная концентрация ионов серебра 0,05 г/л в присутствии папаина в буферном растворе, когда активность фермента падает некритично, что позволят использовать одновременно фермент и ионы серебра при их иммобилизации в биогелевую матрицу. Температурные профили нативного и иммобилизованного папаина в присутствии ионов серебра сохраняли свою конфигурацию в интервале температур 25- 90^{0}С. Однако, температурный максимум иммобилизованного фермента смещался в область более высоких значений по сравнению с нативным белком.

Антимикробные свойства нитрата серебра способствовали сохранению протеолитической активности иммобилизованного фермента в биогеле в течении 4-6 недель.

Литература
1. Волосова Е.В., Безгина Ю.А., Мазницына Л.В. Стабилизация ферментов класса протеаз в структуре биополимерных материалов - *Современные проблемы науки и образования*, 2013, № 1, 80с.
2. Фидоровская Ю.С., Олтаржевская Н.Д., Медушева Е.О. Биополимерная гидрогелевая композиция с комплексным эффектом для лечения гнойных ран - *Международная конференция «Биоматериалы и нанобиоматериалы: передовые проблемы токсикологии и экологии в области безопасности»*, 2020, 24с.

Работа выполнена в рамках задания ФГБУ «Фонд содействия инновациям».

ОТ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ БИОТЕСТОВ ДО БИОСЕНСОРОВ: МЕТОДЫ, РЕАГЕНТЫ И ПРИБОРЫ

Кратасюк В.А. [а,б] **, Есимбекова Е.Н.**[а,б]

[а] *Сибирский федеральный университет, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79, e-mail: valkrat@mail.ru*
[б] *Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50*

Для решения актуальных проблем экологического и других видов мониторинга разрабатываются ферментативные биотесты, основанные на использовании полиферментных систем, сопряженных с бактериальной люциферазой. В противовес методам химического анализа, которые занимаются поиском в окружающей среде известных загрязнителей и токсичных веществ и сравнивают их концентрацию с ПДК, ферментативные биотесты дают интегральную оценку качества или загрязнения анализируемой среды и, также как классические биотесты, показывают влияние вредных веществ на функции живых организмов (рыбы, водоросли, растения, дафнии, бактерии и т.д.). Методология комплексного ферментативного биотеста предусматривает замену живых организмов на набор репрезентативных ферментативных систем, каждая из которых обеспечивает, а значит моделирует какую либо ключевую функцию организма –свечение, дыхание и т.д. Принципы выбора ферментных систем зависят от задач исследования. Как пример, определены составы такого теста для исследования загрязнения городских и сельскохозяйственных почв, на основе специфического действия токсикантов на ферменты. Для увеличения сроков использования ферментов и их комплексов была разработана методология получения иммобилизованных реагентов «Энзимолюм», содержащих в своем составе ферменты и их субстраты для проведения одного измерения, по сути являющихся биологическим модулем биосенсора. Предлагаемые подходы обеспечивают ферментативным биотестам ценовые преимущества, универсальность, высокую чувствительность и точность, быстрый отклик, а реагенты обладают стабильностью и увеличенным сроком хранения. Подобные комплексные биотесты используются не только для оценки качества почвы, но и для мониторинга природных и промышленных водных экосистем, загрязнения воздуха, а также для анализа качества пищевых продуктом, разнообразных материалов, включая наноматериалы.

Таким образом, на основе ферментативных биотестов разрабатываются основные элементы биосенсоров. Во первых, в качестве объекта, на основе которого создается биологический модуль выбраны ферменты светящихся бактерий, при этом изучаются механизмы влияния разнообразных химических соединений на кинетику ферментативных систем, выясняются условия, обеспечивающие максимальную чувствительность ферментов к ксенобиотикам. Во-вторых, при изготовлении биологического модуля используется иммобилизация, позволяющая получить «сухой реагент», что также характерно для биосенсоров. Регистрацию сигнала –чаще всего это интенсивность свечения –производят на приборах –биолюминометрах. Кроме этого, отрабатывается способы создания биочипов на основе микрофлуидных устройств. Наконец, четвертая характеристика биосенсоров связана с обработкой результатов анализа. Для ферментативных биотестов это реализуется в виде компьютерных программ, представляющих собой базы данных, включающие как характеристики эталонных образцов, так и накопленные результаты анализов, и позволяющих сравнивать и охарактеризовать полученные результаты.

Исследование выполнено за счет грантов Российского научного фонда № 16-14-10115 и № 23-25-10039.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Кузьмин А.А., Фокин Н.П., Томилин А.Н.

Институт цитологии Российской Академии Наук,
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект 4,
e-mail: a.kuzmin@incras.ru

Для того, чтобы лучше понимать функционирование организма на клеточном уровне, необходимо знать, какие маркеры в них экспрессированы. Существует множество методов, которые позволяют определить наличие экспрессии генов интереса в определённых тканях, клеточных культурах и даже отдельных клетках. Несмотря на свои преимущества они обладают и определёнными недостатками, основными из которых являются детерминированность поиска, т.е. ожидание экспрессии определённого маркера в определённом месте, а также разрушение состояния, т.е. для того, чтобы проанализировать клетки или ткани интереса их зачастую нужно гомогенизировать, лизировать, отсортировать и т.п.

В своей работе мы разрабатываем два подхода, которые позволяют обойти эти недостатки. Оба этих направления могут позволить независимо от исходных данных и предположений - автоматически детектировать экспрессию гена интереса и передавать эту информацию дочерним клеткам. В первом случае, в качестве модельного гена интереса мы взяли ген транскрипционного фактора Oct4 - *Pou5f1(Oct4)* [1]. Чтобы детектировать его экспрессию автоматически в любой момент времени, мы поместили в клетки ЭСК мыши две конструкции – каждая из которых содержит рекомбиназы: FlpO и Cre. Первая рекомбиназа помещается в 3'-область гена *Pou5f1*, перед старт кодоном, и активирует экспрессию флуоресцентного белка в "Safe-Harbor" локусе – *Rosa26*. В свою очередь вторая рекомбиназа – Cre, «сшитая» с рецепторами Ert2, под действием тамоксифена активирует работу первой рекомбиназы, удаляя последовательность, изначально блокирующую экспрессию FlpO. На первом этапе исследований мы создали и протестировали эмбриональные стволовые клетки, несущие нашу систему детекции, а в дальнейшем показали возможность получения химерных мышей и germ-line перехода для отобранных клеток. К настоящему моменту проводится характеризация потомства полученных трансгенных животных для полномасштабного картирования экспрессии гена *Pou5f1*.

Второе направление связано с использованием CRISPR-технологий для разработки систем детекции транскрипции гена интереса. Их уникальность состоит в том, что применение инструментов CRISPR может позволить вносить информацию об активности того или иного гена в геном клеток, их экспрессирующих. К настоящему моменту существует два основных направления в построении подобных систем детекции – использование белков адаптации и существующих методов редактирования генов [2]. Нами было показано, что применение Cas1/Cas2 белков системы CRISPR адаптации в эукариотических клетках не позволяет «записывать» информацию в искусственные лидер-спейсерные участки. В свою очередь методы, основанные на модификаторах оснований имеют большие перспективы за счёт своей эффективности, на чём в данный момент и сосредоточены наши исследования [3].

Литература
1. Nichols J, et al. *Cell*, 1998, **95**, 379.
2. Schmidt F., et al. *Nature,* 2018, **562**, 380.
3. Jiao C., et al. *Nature Biotechnology,* 2023.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования, соглашение № 075-15-2020-773.

ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ФИТОПАТОГЕНА *DICKEYA SOLANI* С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ DETECTR

Курбатов Л.К.,[а] Хмелева С.А.,[а] Тимошенко О.С.,[а] Новикова Н.С.,[а] Птицын К.Г.,[а] Радько С.П.,[а,б] Лисица А.В.[а,б]

[а]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8
e-mail: kurbatovl@mail.ru
[б]Тюменский государственный университет, Западно-Сибирский межрегиональный научно-образовательный центр, 625000, г. Тюмень, ул. Республики, 142

Технология ДНК-диагностики DETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR *trans* reporter) [1] объединяет метод изотермической амплификации RPA (Recombinase Polymerase Amplification) ДНК-мишени с последующей селективной детекцией целевых ампликонов с помощью CRISPR/Cas нуклеазы Cas12a (Cpf1) и может служить основой для разработки экспресс-тестов для высокоспецифичной детекции разнообразных инфекционных агентов.

Dickeya solani – один из наиболее опасных патогенов среди бактерий, вызывающих заболевание картофеля, известное как «черная ножка», которое причиняет значительный экономический ущерб картофелеводству. Присутствие патогена было предложено детектировать методом RPA, используя праймеры, распознающие последовательности в регионе SOL-C генома *D. solani*. Однако проведённая проверка праймеров на штаммах фитопатогенов картофеля, принадлежащих к родам *Pectobacterium* и *Clavibacter*, показала их неспецифичность – результатом RPA было образование множества ампликонов различного размера, что в случае сопряжения RPA с экспресс-детекцией колориметрическими методами или с помощью тест-полоски приведёт к ложноположительному результату.

Для достижения специфичной детекции *D. solani* мы получили препарат рекомбинантной CRISPR/Cas12a-нуклеазы одностадийной очисткой методом аффинной хроматографии после её гетерологической экспрессии в клетках *E. coli*, исключив этапы очистки ионообменной хроматографией и гель-фильтрацией. Такая модификация значительно упростила процедуру очистки, сократив её время и потери целевого белка без существенного снижения удельной ферментативной активности нуклеазы. Полученная CRISPR/Cas12a-нуклеаза в комбинации с RPA позволила однозначно определять появление целевых ампликонов (RPA-продукты без дополнительной очистки добавлялись в реакционную смесь с Cas12a-нуклеазой), тем самым обеспечив требуемую селективность теста в целом. Предел обнаружения составил 5 бактериальных геномов на реакционную пробу. Таким образом, технология DETECTR является перспективным подходом к созданию высокоселективных тестов для экспресс-детекции фитопатогенов.

Литература

Chen J. S., Ma E., Harrington L.B., Da Costa M., Tian X., Palefsky J.M., Doudna J.A. CRISPR–Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 2018, **360**, pp. 436-439

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019-2027 годы (соглашение №075-15-2021-1345, Уникальный идентификатор проекта RF----193021X0012).

ОСОБЕННОСТИ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ АРКТИЧЕСКОГО РЕГИОНА РС(Я)

Лифшиц С.Х., Глязнецова Ю.С., Чалая О.Н., Зуева И.Н.

Институт проблем нефти и газа ФИЦ ЯНЦ СО РАН,
677981, Якутск, ул.Петровского, 2
e-mail: lifsara@yandex.ru

В настоящее время основными загрязнителями почв являются нефть и нефтепродукты. Эти загрязнения проникли уже и в зону Арктики. Пока нефтезагрязнения в Арктическом регионе Республики Саха (Якутия) сосредоточены преимущественно на объектах нефтегазовых комплексов (нефтебазы, автозаправки), в донных осадках морских и речных причалов, однако в связи с предстоящим освоением углеводородных запасов арктического региона распространение нефтезагрязнений будет только возрастать. Самовосстановление почв в условиях Арктики протекает крайне медленно. Биодеградация нефти и нефтепродуктов осуществляется преимущественно по типу гниения и арктические почвы начинают заселять гнилостные и патогенные микроорганизмы. Вследствие этого особенно актуальной задачей является разработка эффективных методов очистки арктических почв от нефтезагрязнений. Наиболее экологичными являются биологические способы восстановления почв, согласно которым в нефтезагрязненную почву вносятся углеводородокисляющие микроорганизмы (УОМ). Особенностью этих микроорганизмов является способность использовать углеводороды нефти в качестве пищевого субстрата путем их окисления. Следует отметить, что арктические почвы характеризуются низкой концентрацией аборигенных УОМ, либо эти УОМ вообще отсутствуют. Вследствие этого для проведения биологической очистки необходима интродукция в почву УОМ, характеризующихся способностью к жизнедеятельности в условиях низких температур.

Были проведены натурные эксперименты по очистке арктических почв от нефтезагрязнений с использованием биологического способа очистки – интродукции в почву аборигенных УОМ. Эксперимент проводился на территории Нижнеколымской нефтебазы. Исследуемые участки были загрязнены нефтью и дизельным топливом с давними сроками загрязнения. Такие загрязнения особенно сложно поддаются очистке. Результаты экспериментов показали низкий коэффициент деструкции нефтезагрязнения – 17% в первый летний сезон. В следующий летний сезон уровень нефтезагрязнения практически не изменился. При этом численность УОМ, возросшая к концу первого летнего сезона, после зимнего периода уже не восстановилась. По-видимому, это связано с тем, что арктические почвы большую часть времени находятся в замерзшем состоянии, что нарушает водно-воздушный обмен приповерхностных слоев почвы с атмосферой. В отсутствии кислорода УОМ проигрывают в конкуренции с другими микроорганизмами за доступное органическое вещество, вследствие чего их численность падает.

Таким образом, в арктических условиях применение биологического способа очистки почв от нефтезагрязнений сталкивается с проблемой выживаемости УОМ в долгий зимний период, что необходимо учитывать при проведении биоремедиационных мероприятий. Также следует продолжить исследования по разработке эффективных способов очистки арктических почв от нефтезагрязнений.

Работа выполнена в рамках Госзадания Министерства науки и высшего образования РФ №122011200369-1 с использованием научного оборудования ЦКП ФИЦ ЯНЦ СО РАН в рамках гранта №13.ЦКП.21.0016.

ГИБРИДНЫЕ МИКРОСФЕРЫ ВАТЕРИТА С ПОЛИСАХАРИДАМИ: ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА, ИММОБИЛИЗАЦИЯ КАТАЛАЗЫ

Мальцева Л.Н.[1], Мосиевич Д.В.[1], Мишин П.И.[1], Филатова Л.Ю.[1], Киржанова Е.А.[1], Клинов Д.В.[2], Михальчик Е.В.[2], Балабушевич Н.Г.[1]

[1]Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1-11, liya.malceva.00@mail.ru
[2]ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, 119435, Москва, Малая Пироговская, 1а

Использование различных биополимеров при формировании частиц ватерита позволяет получить гибридные сферы с измененными структурой, стабильностью, свойствами, характеризующиеся лучшим включением и удерживанием низкомолекулярных и положительно заряженных веществ.

Цель работы заключалась в исследовании гибридных микросфер ватерита с природными полисахаридами и перспектив их использования в средствах доставки. Контрольные (СС) и гибридные микросферы ватерита с соосажденными декстрансульфатом (ССДС), хондроитинсульфатом А (ССХС), гепарином (ССГ), фукоиданом (ССФ) и пектином (ССП) получали методом спонтанной кристаллизации, анализировали с помощью динамического лазерного светорассеяния, низкотемпературной адсорбции-десорбции азота, сканирующей электронной микроскопии и рентгенофазового анализа (таблица). Была оценена адсорбция на микросферах ватерита сывороточного альбумина, муцина и каталазы и проанализированы свойства иммобилизованного антиоксидантного фермента.

Таблица. Характеристика микросфер ватерита с полисахаридами

Сферы	ζ – потенциал, мВ	Диаметр, мкм	Площадь поверхности, $м^2/г$	Размер пор, Å	Включение, мг/г			Разложение H_2O_2	
					альбумин	муцин	каталаза	K_m, мМ	V_{max}, М /мин
СС	2±1	4±1	36±4	111	14±2	7±2	19±5	4±1	0,007±0,001
ССДС	-13±2	4±1	35±4	38	12±3	1±1	15±4	15±6	0,031±0,013
ССХС	-12±2	2±1	47±5	115	13±2	8±2	18±5	16±8	0,021±0,004
ССГ	-9±1	2±1	62±6	41	11±2	2±1	11±3	23±6	0,023±0,006
ССФ	-12±1	2±1	58±6	36	7±1	3±1	4±1	5±2	0,007±0,002
ССП	-12±1	3±1	95±10	38	8±1	4±1	8±2	2±1	0,010±0,001

По сравнению с контрольными гибридные микросферы имели отрицательный поверхностный заряд, большую площадь поверхности (кроме ССДС) и меньший размер пор (кроме ССХС). Наибольшее связывание альбумина, муцина и каталазы наблюдалось на микросферах СС и ССХС, что обусловлено большим размером пор частиц. Иммобилизация приводила к снижению K_m и V_{max} каталазы по сравнению с нативным ферментом (соответственно 73,8±31,9 мМ и 0,620±0,026 М/мин).

Выявленные особенности необходимо учитывать при использовании гибридных микросфер ватерита с природными полисахаридами для доставки терапевтически важных белков, в том числе, с антиоксидантной активностью.

Работа выполнена в рамках государственного задания тема 121041500039-8 и поддержана РНФ (23-45-10026).

РОЛЬ МЕЛАТОНИНА ПРИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Маркарова Е.В., Муравьева А.Б., Эльбекьян К.С.

Ставропольский государственный медицинский университет,
355000, Ставрополь, ул. Мира 310
e-mail: chemistry_stgmu@mail.ru

В развитии сахарного диабета важную роль играет гипоэнергетическое состояние организма, причиной которого становится дисфункция митохондрий. Фармакотерапия диабета на сегодняшний день, продолжает оставаться актуальным вопросом. Благодаря своим биологическим и фармакологическим свойствам в последнее время интерес исследователей стал привлекать гормон эпифиза- мелатонин. В партнерстве с мелатонином сукцинатдегидрогеназа (СДГ) может представлять собой важный антиоксидантный фермент в митохондриях.

Целью исследования явилось изучение влияния мелатонина на активность митохондриальной сукцинатдегидрогеназы при экспериментальном аллоксановом диабете.

Исследования проводили на самцах крыс линии Wistar массой 120—150 г, которые содержались на стандартной диете. Животные были разделены на 4 группы. Контрольной группе вводили физиологический раствор, второй группе - мелатонин в дозе 1 мг/кг ежедневно в течение 14 дней, экспериментальный диабет у животных моделировали внутрибрюшинным введением аллоксана в дозе 150 мг/кг. Четвертая группа животных получала мелатонин на фоне аллоксана. Активность СДГ определяли в тканях печени и поджелудочной железы фотометрическим методом. Для проведения докинг-анализа использовались пакеты программ AutoDock Vina и AutoDock Tools.

Согласно полученным результатам под влиянием аллоксана в активности СДГ печени и поджелудочной железе возникают взаимозависимые отношения**.** Токсин вызывает увеличение активности СДГ в печени в 1,9 раза, а в ткани поджелудочной железы наблюдается значимое снижение в 5 раз. Использование же гормона у животных с аллоксановым диабетом привело к уменьшению активности сукцинатдегидрогеназы в печени в 1,5 раза в сравнении с показателями крыс с диабетом. В поджелудочной железе, наблюдали противоположные сдвиги, активность фермента повышалась в 3,3 раза, что может указывать на восстановление функции β-клеток Лангерганса. Таким образом, исходя из данных докинг-анализа установлено, что мелатонин блокируя домен А сукцинатдегидрогеназы, снижает гиперактивность фермента в печени, а в поджелудочной железе через свои специфические рецепторы (MP1 и MP2), присутствующие на поверхности мембран β- и α-клеток, оказывает прямое вмешательство в функцию клеточных элементов островков Лангерганса, восстанавливая их.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ КОМБИНАЦИИ БАЦИТРАЦИНА И ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ В ОТНОШЕНИИ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS*

Маслова О.В., Асланлы А.Г., Сенько О.В., Ефременко Е.Н.

Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы 1/3,
e-mail: olga.maslova.rabota@gmail.com

Комплексные препараты представляют собой одно из возможных решений ряда актуальных проблем, связанных с контролированием и предотвращением поражений различных биообъектов мицелиальными грибами и дрожжами. Состав таких препаратов должен соответствовать требованиям современных ориентиров на экологическую безопасность в процессе и после их применения. Эффективность действия комплексных препаратов может быть улучшена за счет комбинирования компонентов, входящих в их состав, которые могут оказывать разностороннее воздействие на целевые микроорганизмы – регулировать их рост, развитие, метаболическую активность, защитные механизмы.

На основании ранее полученных результатов [1] и результатов предварительного скрининга в качестве возможных кандидатов для включения в состав комплексного биопрепарата были отобраны: антмикробный пептид бацитрацин и фермент пенициллинацилаза PvdQ.

Эффективность антимикробного воздействия бацитрацина по отношению к грибам рода *Aspergillus* оценивалась по величине концентрации внутриклеточного АТФ при использовании пептида индивидуально (в диапазоне концентраций от 0 до 164 мг/л) или в комбинаций с PvdQ (32 мг/л). В стерильный физиологический раствор при pH 7,5 вносилась грибная биомасса, в раствор добавлялся бацитрацин или его комбинация с ферментом. Через 24 ч проводилась оценка эффективности действия антимикробных агентов. В качестве контроля использовался раствор с грибной биомассой без внесения препаратов. Установлено, что при концентрации бацитрацина 35 мг/л и выше при его сочетании с PvdQ эффект антимикробного воздействия был выражен сильнее (на 7-16%), чем при индивидуальном введении бацитрацина в среду с биомассой гриба.

Литература
1. Aslanli A., Domnin M., Stepanov N., Efremenko E. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, **23**. 9400.

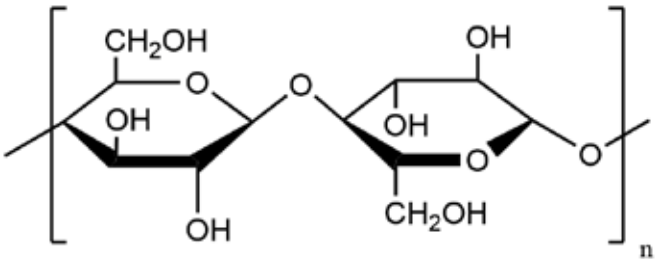
Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 23-14-00092.

КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ ГРАФЕНОПОДОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ: СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ, ПЕРСПЕКТИВЫ

Решетилов А.Н.,[а] Плеханова Ю.В.,[а] Тарасов С.Е.,[а] Гуторов М.А.,[б] Кленова Н.А.[в]

[а] Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФГБУН "ФИЦ ПНЦБИ РАН", Московская обл., Пущино, 142290 Россия, e-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru
[б]ООО «ГАММА», 124536, Москва, Зеленоград, Россия
[в] Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева, Самара, 443086 Россия

Бактериальная целлюлоза (БЦ) представляет собой натуральный полимер с уникальными физическими и механическими свойствами, которые обусловлены её структурой из микроволокон с высокой площадью поверхности. При этом низкая проводимость БЦ ограничивает ее применение в качестве компонента электронных устройств, в том числе биосенсоров [1].



Одним из наиболее распространенных способов улучшения проводимости полимеров является добавление углеродных наноматериалов в их структуру. К наиболее перспективным углеродным наноматериалам для использования в композициях с БЦ относятся графеноподобные наноматериалы, такие как графен, восстановленный оксид графена, терморасширенный графит и т.д. Их высокая проводимость и большая активная площадь поверхности позволяет облегчать электронный перенос в композите для использования в составе биоэлектрохимических устройств, таких как биосенсоры, биотопливные элементы и суперконденсаторы.

В работе рассмотрены варианты композиций графеноподобных наноматериалов с БЦ, показано изменение свойств полимера при его модификации, а также предложены возможные области применения данных композитов. Например, использование композита ТРГ-БЦ в составе амперометрических микробных биосенсоров позволяет создать эффективную матрицу для иммобилизации бактериальных клеток [2]. Представлены также варианты композитов на основе БЦ и графеновых наноматериалов для разработки устройств гибкой электроники, которые могут служить для хранения энергии (суперконденсаторы), для очистки водных сред от загрязнений (биотопливные элементы) и в области биомедицины (биосенсоры).

Литература
1. Troncoso O.P., Torres F.G. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 6532.
2. Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Китова А.Е. и др. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2022, **58** (4), 388.

ИНФОРМАЦИОННОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРОИЗВОДСТВА РАДИОКОМПОНЕНТОВ НА ПРЕДПРИЯТИИ ЗАО «ЭЛЕКТРОКОНТАКТ» Г. ЙОШКАР-ОЛА

Романов С.С.

Научный руководитель: Шишкин Геннадий Анатольевич, к.т.н., доцент
(Поволжский государственный технологический университет – ПГТУ, г. Йошкар-Ола)

Аннотация

Данная статья рассматривает различные аспекты внедрения автоматизированной информационной системы управления и контроля производства. Разработана и представлена структурная схема АСУ для конкретного предприятия в г. Йошкар – Ола.

1. Введение

Автоматизированная система управления технологическими процессами (АСУТП) представляет собой комплекс программно-технических средств, который обеспечивает автоматический контроль и управление процессами производства. Внедрение АСУТП обеспечивает возможность быстрого и гибкого реагирования на изменения в производственных процессах, уменьшает риски ошибок и сбоев в работе, что повышает надежность работы производственного оборудования.

2. Структурная модель АСУТП предприятия

В данной работе предложен вариант создания автоматизированной информационной системы управления и контроля технологическими процессами на производстве радиокомпонентов ЗАО «Электроконтакт». Анализируя структуру работы производства, его технологические процессы, рабочие участки была разработана общая структурная схема АСУТП предприятия:

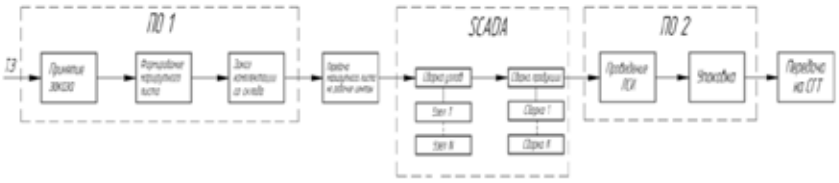


Рис. 1 – Структурная схема АСУТП предприятия.

Автоматизированная система управления технологическими процессами состоит из трёх уровней:

- Технологическая задача поступает на пункт принятия заказов на АРМ мастера производства. Мастер при помощи прикладного программного обеспечения просматривает данные о типе продукции, его комплектации и наличии её на складе, либо на рабочих центрах производства. После просмотра информации формируется операционная карта, которая передаётся на рабочие центры работников, где начинается сборка узлов и сама продукция.
- При помощи SCADA – систем и прикладных программ каждый рабочий за конкретным АРМ просматривает данные заказа, а так же технологический процесс сборки, заносит данные серийных номеров присоединяющихся комплектаций в систему.
- После сборки продукции происходит процесс приёмо-сдаточных испытаний, где рабочий из испытуемого персонала проводят проверку правильности собранной продукции и полученных данных испытаний.

3. Заключение

Предложенная модель внедрения АСУТП позволит организовать процессы производства с максимальной эффективностью и надежностью. Структурная схема включает в себя различные подсистемы, которые обеспечивают автоматизацию управления производством, информационное сопровождение технологических процессов, контроль качества продукции.

Список литературы

1. Vdovenko, L.A. Automated production management systems// Economic education, – 1992, – P. 395.
2. Korotkova, E.M. Research of control systems// DeKa, – 200, – P. 160.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ БЕТА-ЛАКТАМАЗ TEM-, CTX-M- И NDM-ТИПОВ НА АКТИВНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Рубцова М.Ю., Уляшова М.М., Преснова Г.В., Егоров А.М.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.3
e-mail: myr@enz.chem.msu.ru

Суперсемейство бета-лактамаз (БЛ), гидролизующих бета-лактамные антибиотики и вследствие этого обуславливающих устойчивость к ним патогенных бактерий, является объектом фундаментального изучения влияния мутаций аминокислотных остатков на активность и термостабильность ферментов. Поиск участков белковой глобулы, модификация которых приводят к изменениям каталитической активности и стабильности, необходим для создания ингибиторов ферментов нового поколения. В процессе эволюции бактерий, ускорившейся в результате активного применения антибиотиков в клинической медицине и ветеринарии, произошло существенное расширение суперсемейства БЛ, особенностью которого является объединение ферментов с серин- и цинк-содержащими активными центрами, что значительно расширяет их специфичность и увеличивает эффективность гидролиза разных групп бета-лактамов. Локализация генов бета-лактамаз на мобильных генетических элементах способствует их быстрому распространению.

На основании гомологии первичных последовательностей БЛ разделяются на четыре молекулярных класса (A, B, C и D), которые далее разделяются на типы. Эволюция БЛ происходит по двум направлениям: появление новых типов ферментов и новых мутаций в генах ферментов каждого типа БЛ. По своему влиянию на каталитическую активность ферментов мутации делят на ключевые, влияющие на субстратную специфичность и сопутствующие, некоторые из которых влияют на термостабильность и обеспечивают аллостерическую регуляцию активности.

БЛ TEM-типа являются наиболее активно мутирующими ферментами: в процессе эволюции замены произошли в 40% аминокислотных остатков БЛ TEM-1. К ключевым относят восемь мутаций: замены остатков E104, R164, G238 и E240 расширяют субстратную специфичность в отношении оксиимино-цефалоспоринов, мутации остатков M69, R244, R275, N276 приводят к устойчивости к ингибиторам бета-лактамной природы. У БЛ CTX-M типа к ключевым относят мутации остатков P167 и D240, изменяющие субстратную специфичность в отношении отдельных цефалоспоринов III поколения. Мутации M182T (TEM-тип) и V77A (CTX-M тип) повышают термостабильность ферментов. У метало-бета-лактамаз NDM-типа термостабилизирующей является замена M154L. Наиболее стабильной является БЛ NDM-16, у которой замена M154L сочетается с заменами V88L и A233V. Установлено, что замена M154L обеспечивает резистентность даже при снижении аффинности к ионам цинка: NDM-15, имеющая комбинацию замен M154L и A233V, сохраняет способность связывать только один атом цинка и при этом характеризуется достаточно высокой каталитической активностью (kcat/Km всего в 2 раза меньше по сравнению с NDM-1).

Особое внимание в настоящее время уделяется изучению мутационной изменчивости петель - подвижных структурных элементов БЛ, играющих роль в регуляции их ферментативной активности. В частности, омега–петля сериновых БЛ класса A, расположенная на стыке 2-х доменов в нижней части входа в активный центр, является одной из функционально важных петель. У сериновых БЛ класса A к ключевым мутациям относят мутации остатков омега-петли (R164 у бета-лактамаз TEM типа, P167 у бета-лактамаз CTX-M типа). У МБЛ NDM-типа наибольшее количество мутаций также происходят в подвижных петлях, например M154L и G69S.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова 123032300028-0.

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ ГИДРОЛИЗ ПОЛИСАХАРИДОВ МИСКАНТУСА ПОСЛЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ

Скиба Е.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, 659322, Россия, Алтайский край, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1
eas08988@mail.ru

Мискантус гигантский – энергетическая культура, занимающая одну из ведущих мировых позиций среди целлюлозосодержащего сырья как по объёмам выращивания и переработки, так и по спектру ценных материалов, в которые трансформируется мискантус [1]. В России по состоянию на 2022 г площади мискантуса гигантского составляют 230 га и ежегодно увеличиваются, в настоящее время составлена база данных химического состава образцов мискантуса гигантского, установлено, он зависит от возраста плантации, сорта, условий местопроизрастания и климатических особенностей [2]. Известно, что жиро-восковая и лигнинная компоненты мискантуса отвечают за его антимикробные свойства. Эти вещества могут ингибировать биокаталитическую трансформацию мискантуса [3]. Поэтому для мискантуса особую значимость приобретает предварительная обработка – критическая стадия в работе с целлюлозосодержащим сырьём.

В данной работе исследовано 4 способа предобработки мискантуса сорта Камис (ООО «Мастер Брэнд», г. Москва) с помощью разбавленных растворов HNO_3 и NaOH при атмосферном давлении, процессы проведены в лабораторных условиях в 4 л колбе и на опытном производстве в стандартном емкостном оборудовании объёмом 250 л. Полученные субстраты подвергнуты ферментативному гидролизу согласно методике [4].

Таблица 1. Результаты ферментативного гидролиза продуктов предобработки мискантуса мискантуса гигантского сорта Камис, начальная концентрация субстрата 30 г/л

Условия получения субстратов	лабораторные условия		условия опытного производства	
Способ предварительной обработки мискантуса	Концен-тра-ция РВ, г/л	Выход РВ от массы субстрата, %	Концентра-ция РВ, г/л	Выход РВ от массы субстрата, %
Нативный мискантус	3,8	11,4	–	–
Предобработка NaOH	11,0	33,3	12,0	36,4
Предобработка NaOH, затем HNO_3	18,1	54,9	19,0	57,6
Предобработка HNO_3	15,1	45,8	20,2	61,2
Предобработка HNO_3, затем NaOH	19,5	59,1	20,6	62,4

После химической предобработки реакционная способность к ферментативному гидролизу повышается в 2,9-5,1 раз по сравнению с нативным сырьём в лабораторных условиях и в 3,2-5,4 раз – в условиях опытного производства, при этом наиболее эффективной оказалось предобработка с помощью HNO_3 на первой стадии.

Литература
1. Wang C. et al. *GCB Bioenergy, 13(1), 58-69.* https://doi.org/10.1111/gcbb.12761
2. Gismatulina Y.A. et al. *Plants,* 2022, 11, 2791. https://doi.org/10.3390/plants11202791
3. Kim H. et al. *GCB Bioenergy* 13.3 (2021): 436-444. https://doi.org/10.1111/gcbb.12800
4. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. *Polymers,* 2019, 11(10), 1645; https://doi:10.3390/polym11101645

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, https://rscf.ru/project/22-13-00107/

ИНГИБИТОРЫ ГАЛАКТОНОЛАКТОНОКСИДАЗЫ ИЗ *TRYPANOSOMA CRUZI* И L-ГАЛАКТОН-1,4-ЛАКТОНДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Чудин А.А., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3,
e-mail: andrew_18@inbox.ru

Ингибирование путей биосинтеза соединений, жизненно необходимых микроорганизму *Trypanosoma cruzi*, рассматривается учёными как один из возможных механизмов действия потенциальных лекарств против болезни Шагаса, вызываемой данным паразитом. В качестве одного из таких механизмов мы рассматриваем ингибирование мембранного митохондриального фермента галактонолактоноксидазы из *T. cruzi* (TcGAL), катализирующего финальную стадию синтеза витамина С – антиоксиданта, который *T. cruzi не* способна усваивать извне и вынуждена синтезировать сама [1]. Учитывая, что TcGAL – водонерастворимый фермент, требующий применения специальной системы обращённых мицелл АОТ, предварительный скрининг ингибиторов целесообразно проводить с использованием гомологичного водорастворимого фермента L-галактон-1,4-лактондегидрогеназы из растения *Arabidopsis thaliana*, катализирующего ту же реакцию.

В рамках данной работы изучено ингибирование TcGAL и AtGALDH соединениями класса аллилбензолов. Найдено, что природные аллилполиалкоксибензолы (АПАБ), такие как апиол, диллапиол и др., являются эффективными ингибиторами TcGAL с низким IC50 = 20–100 мкМ; установлен неконкурентный механизм действия апиола в отношении TcGAL. Конъюгирование АПАБ с трифенилфосфонием, обеспечивающим селективную доставку биологически активных веществ в митохондрии, позволяет повысить эффективность ингибирования по сравнению с немодифицированными АПАБ. Эффект АПАБ в отношении растительного фермента AtGALDH гораздо менее выражен чем для TcGAL, несмотря на высокое сходство активных центров. Это может быть обусловлено различным влиянием ингибитора на оксидазную и дегидрогеназную активность (оксидазная и дегидрогеназная для TcGAL и AtGALDH соответственно). Для подтверждения данной гипотезы было проведено сравнение ингибирования дикой формы AtGALDH и мутантной формы, обладающей оксидазной активностью. Обнаружено, что мутантная форма AtGALDH ингибируется лучше, чем дикая, однако значительно хуже, чем TcGAL. Причиной более низкой эффективности ингибирования обеих форм AtGALDH по сравнению с TcGAL видимо является распределение AtGALDH по всему объёму водной фазы мицелл, в то время как TcGAL располагается на границе раздела фаз, где согласно работе [2] локализованы ингибиторы класса АПАБ. Полученные результаты важны для понимания различий в функционировании мембранных ферментов различного происхождения: из растительных, животных и бактериальных источников.

Литература
1. Chudin A.A., Kudryashova E.V. *Analytica (MDPI), 2022,* **3, 1.**
2. Чудин А.А., Злотников И.Д., Крылов С.С., Семенов В.В., Кудряшова Е.В. *Биохимия*, 2023, **88, 1.**

Работа выполнена с использованием оборудования (ИК-спектрометр Фурье Bruker Tensor 27 (Германия) и КД-спектрометр Jasco J-815 (Япония)) по программе развития МГУ.

СТРАТЕГИЯ СНИЖЕНИЯ УГЛЕРОДНОГО СЛЕДА ЧЕРЕЗ БИОКАТАЛИТИЧЕСКУЮ ПЕРЕРАБОТКУ МИСКАНТУСА

Шавыркина Н.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, 659322, Россия, Алтайский край, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1, 32nadina@mail.ru

Все более критичным становится изменение климата из-за накопления парниковых газов в результате эксплуатации невозобновляемых энергетических ресурсов [1]. Одним из путей, способствующих уменьшению этих последствий, является переработка биомассы энергетических растений, таких как мискантус [2]. Намечено несколько стратегических направлений использования мискантуса для снижения углеродного следа – от аграрного аспекта до биокаталитической переработки в ценные продукты [3].

В данной работе исследован биосинтез бактериальной наноцеллюлозы (БНЦ) на средах из биомассы мискантуса, предварительно обработанной разными способами разбавленными растворами HNO_3 и NaOH при атмосферном давлении, и затем подвергнутой ферментативному гидролизу по методике [4]. В гидролизаты вносили чай черный байховый (10 г/л) и использовали в качестве питательных сред для биосинтеза БНЦ. Контролем служила полусинтетическая питательная среда на основе черного байхового чая и глюкозы. В питательные среды вносили продуцент - симбиотическую культуру *Medusomyces gisevii* (10 % от объема среды), культивирование вели статическим способом при температуре 27°С в течении 10 суток, затем пленки БНЦ промывали, высушивали лиофильно и рассчитывали выход в пересчете на редуцирующие вещества (РВ). Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. *Результаты биосинтеза БНЦ на гидролизных средах*

Предобработка биомассы мискантуса	Концентрация РВ до и после биосинтеза, г/л		Численность уксуснокислых бактерий до и после биосинтеза, млн/мл		Выход БНЦ, %
Контроль	20,00	0,80	12,5	18,00	11,80
HNO_3	20,17	5,40		30,50	11,66
HNO_3, затем NaOH	20,60	3,20		22,50	8,63
NaOH	1,70	0,90		4,50	3,00
NaOH,затем HNO_3	19,05	3,10		11,00	10,40

Можно говорить о том, что обработка биомассы мискантуса раствором NaOH не позволяет получить субстрат для биокаталитической конверсии. Для биосинтеза БНЦ оптимальной является одностадийная предобработка биомассы раствором HNO_3, выход БНЦ на данной гидролизной среде на уровне контроля, при этом численность уксуснокислых микроорганизмов (продуцентов БНЦ) в 1,7 раза выше.

Литература

Entezaminia A., Gharbi A., Ouhimmou, M. *J. Clean. Prod*., 2021, 293, 125973. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.125973

Cintas O. et al. *GCB Bioenergy*, 2017, 9 (7), 1238–1251. https://doi.org/10.1111/gcbb.12425

Velvizhi G. et al. *Fuel*, 2022, 313, 122678. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122678

Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. *Polymers,* 2019, 11(10), 1645; https://doi:10.3390/polym11101645

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, https://rscf.ru/project/22-13-00107/

ЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ В МИТОХОНДРИИ

Шаповалов Ю.А.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби,
050040, Алматы, Казахстан, проспект аль-Фараби 71
yu.shapovalov@mail.ru

Электрон-транспортная цепь митохондрии сформирована четырьмя комплексами. Комплекс I представляет собой биологический генератор тока, в котором происходит окисление восстановленной формы кофермента (NADH·H). Ферментативная реакция окисления NADH·H сопровождается восстановлением кофермента $FMNH_2$, который, в свою очередь, передает электроны по цепи из 8 железосерных кластеров коферменту CoQ_{10}, восстанавливая его в $CoQ_{10}H_2$. CoQ_{10} приобретает протоны из матрикса митохондрии и прокачивает их в межмембранное пространство при передаче электронов железосерному белку Риске в комплексе III. Железосерные кластеры осуществляют транспорт только электронов, в то время как CoQ_{10} как электронов, так и протонов.

Аналогичный механизм генерации тока и работа протонной помпы реализуется в комплексе II, в котором фермент сукцинатдегидрогеназа окисляет сукцинат до фумарата. При этом происходит восстановление кофермента FAD в $FADH_2$, передающего далее электроны 3-м железосерным кластерам и CoQ_{10} для его восстановления до $CoQ_{10}H_2$.

Железосерный белок Риске регулирует направление потоков электронов в комплексе III: один электрон передается цитохрому c, а другой комплексу bL,bH, что сопровождается сбросом 2-х протонов в межмембранное пространство митохондрии и является необходимым для формирования градиента H^+ при синтезе АТР в комплексе V.

В комплексе IV электроны переносятся к кислороду по схеме: цитохром c → [CuA-CuB] → [FeA-FeB] → CuC → O_2. Топливные элементы комплексов I и II генерируют электроны, восстанавливающие ион железа гема цитохрома c. Спаренные биядерные центры ионов меди [CuA-CuB] и железа [FeA-FeB] обеспечивают эффективное протекание электро-каталитических реакций и транспорт электронов. Восстановленный ион гема железа цитохрома c является анодом электролизера комплекса IV. На аноде, ионе железа, в нейтральной и кислой среде протекает электрохимическая реакция $2H_2O - 4\ e^- \rightarrow O_2 + 4H^+$ с окислением Fe^{2+} до Fe^{3+}. Образовавшиеся в результате электродной реакции 4H+ направляются в межмембранное пространство митохондрии, в то время как $4e^-$ участвуют в восстановлении O_2 на катоде – ионе меди (Cu^+) порфирина - по реакции $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$ с протонами из матрикса митохондрии. Регенерация Cu^+ происходит в результате транспорта электронов от цитохрома c по электрон-транспортной цепи спаренных биядерных центров ионов меди [CuA-CuB] и железа [FeA-FeB]. Механизм переноса электронов в гальванической паре меди и железа представляет собой ряд последовательных электрохимических окислительно-восстановительных реакций ионов железа $Fe^{2+} - e^- \rightarrow Fe^{3+}$ и меди $Cu^{2+} + e^- \rightarrow Cu^+$.

В наноэлектродных системах, где расстояние между двумя электродами менее 200 нм, протекает безэлектролитный электролиз воды. Это происходит за счет перекрывания двойных электрических слоев двух электродов, что приводит к существенному снижению сопротивления между двумя электродами и возникновению сильнейшего электрического поля, обеспечивающего электролиз воды. Расстояние в полуэлементах гальванической пары ионов железа и меди в электролизере митохондрии всего 0,5 нм, обеспечивающее в электролизной системе комплекса IV высокую эффективность окисления воды на аноде и восстановления кислорода на катоде.

ЭЛЕКТРОФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОТОСИНТЕЗА

Шаповалов Ю.А.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби,
050040, Алматы, Казахстан, проспект аль-Фараби 71
yu.shapovalov@mail.ru

Фотосинтез, является основным процессом, реализуемым в биосфере, связан с конверсией солнечной энергии в энергию химических связей. Процесс фотосинтеза протекает при взаимодействии двух комплексов ФС-I и ФС-II, локализованных в хлоропластах фотосинтетических мембран тилакоидов. Для эффективного сбора солнечной энергии тилакоиды хлоропластов уложены в граны, которые связаны ламелами в единую энергетическую сеть (ЕЭС), обеспечивающую энергией ФС-I и ФС-II. Миграция энергии и перенос электронов в хлоропластах осуществляется с участием природных полупроводников: каротинов, хлорофиллов, феофетина, пластохинона, филлохинона, железосерных кластеров, способных образовывать комплексы с переносом заряда (КПЗ). При этом формируется высокоорганизованная структура упакованных молекул, по которой могут свободно мигрировать электроны и экситоны.

Процесс фотосинтеза начинается с переноса энергии от ЕЭС на кластер $Mn_4O_5Ca(H_2O)_4$ активного центра H_2O-пластохинооксидоредуктазы (ФС-II). Кубическая конфигурация марганцевого кластера формирует водородные связи атомов водорода воды с кислородом кластера. В результате конформационных изменений фермента и кластера под воздействием солнечной энергии химические связи воды разрываются, образуя атомарный кислород и 2 протона по реакции $H_2O \rightarrow O+2H^+$. Высокоактивный атомарный кислород в водной среде образует перекись водорода $O+H_2O \rightarrow H_2O_2$. Электрохимическое окисление H_2O_2 ионом Mn^{4+} в нейтральной среде приводит к образованию кислорода и двух протонов $H_2O_2\text{-}2e^- \rightarrow O_2{\uparrow}+2H^+$+23,5 ккал. При этом Mn^{4+} восстанавливается до Mn^{2+}. Регенерация Mn^{4+} из Mn^{2+} происходит при передаче восстановительных эквивалентов в ФС-I. Прежде, чем поток электронов от генератора тока ФС-II будет доставлен ФС-I, он направляется в цитохром-b_6f-комплекс, представляющий собой природный конденсатор с накоплением зарядов за счет восстановления Fe^{+3} в Fe^{+2} в гемовых структурах цитохромов.

От цитохром-b6f-комплекса электроны пластоцианином переносятся в двухэлектродную электролизную систему (P700) ФС-I, образованную 2-мя парами хлорофиллов. В электролизере протекают электрохимические реакции окисления воды на хлорофилле - аноде: $2H_2O \rightarrow O_2{\uparrow}+ 4H^+ + 4e^-$ и хлорофилле-катоде: $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2{\uparrow}$. При этом электронную цепь фотоэлектролизера P700 замыкает триггер, железосерный кластер Fx ($[Fe_4S_4]$) с логической функцией «И». Триггерная система в ФС-I построена из трех железносерных кластеров Fx, F_1, F_2. Железосерный кластер Fx $[Fe_4S_4]$, замыкая электрон-транспортную цепь фотоэлектролизера P700, направляет электроны триггерной системе F_1 и F_2 («ИЛИ»). Триггер «ИЛИ» отправляет поток электронов для восстановления кофермента $NADP^+$ в $NADPH{\cdot}H$ через ферредоксин - Fd. Вероятно, Fd является точкой бифуркации, где происходит передача одного электрона для ферментативного восстановления $NADP^+$, а другого, в реакцию с ферредоксин:хинон-редуктазой для восстановления пластохинона PQ в PQH_2 и затем – в комплекс b_6f (конденсатор). При дефиците $NADP^+$ и полной загрузке конденсатора триггер «ИЛИ» переключает систему на вывод избытка электронов и протонов в атмосферу в виде восстановленного молекулярного водорода, образующегося в результате ферментативной реакции с участием фермента гидрогеназы.

ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ЯЧЕЕК БИОЧИПА НА АЛЮМИНИЕВОЙ ПОВЕРХНОСТИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Шишкин И.Ю., Василисков В.А., Заседателева О.А., Чудинов А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук (ИМБ РАН), 119991, Москва, ул. Вавилова, 32,
e-mail: shishkin.iv2017@yandex.ru

Для анализа нуклеиновых кислот (НК) методом ПЦР на биочипе в качестве подложки необходимо выбрать материал, обладающий высокой теплопроводностью. Алюминий (Al) полностью соответствует этому критерию, однако его прямое присутствие недопустимо из-за ингибирования ДНК-полимеразы и адгезии нуклеиновых кислот, поэтому необходимо провести модификацию его поверхности и получить матрицу ячеек с иммобилизованными олигонуклеотидами.

В данной работе на поверхности Al подложки получили матрицу ячеек с ковалентно иммобилизованными олигонуклеотидами, эффективность иммобилизации и сохранение специфичности проверили в гибридизационном анализе НК.

Поверхность Al подложки промывали щелочным раствором моющего средства, обработали раствором 3-аминопропилтриэтоксисилана (APTES), наносили тонкий слой раствора поливинилацетата (ПВА) и бензофенона (БФ) при вращении (spin-coating). После сушки облучали УФ-светом. Полимерное покрытие прочно связывается с поверхностью, не отслаивается в кипящей воде. Далее наносили второй слой ПВА с БФ при вращении. Над поверхностью подложки формировали камеру с крышкой из кварцевого стекла с нанесённой фотомаской. В камеру вносили раствор глицидилметакрилата, акриламида, гидрохлорида [2-(метакрилокси) этил]диметил-(3-сульфопропил)аммония в смеси вода/метанол (1:1) и облучали УФ-светом через крышку. На поверхности подложки методом фотолитографии, в соответствии с фотомаской, получали ячейки из щеточных полимеров, содержащих активные эпоксидные группы. В ячейках биочипа иммобилизовали олигонуклеотиды с С-6 аминомодификацией на 5`-конце. На чипе был проведен гибридизационный анализ модельной ДНК, меченной Cy5. Методом цифровой флуоресцентной микроскопии оценено «гибридизационное отношение» для совершенных и несовершенных дуплексов с однонуклеотидной заменой, которое составляло 2,3 (см. рисунок 1), что свидетельствует об эффективности иммобилизации олигонуклеотидов и сохранение их специфичности.

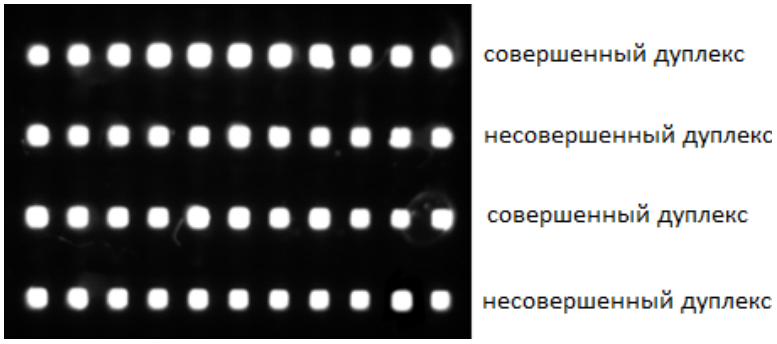


Рисунок 1 – *Флуоресцентная картина биочипа на канале Cy5.*

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 20-14-00287-П.

ФОТОХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТА «ЩЁТОЧНЫМИ» ПОЛИМЕРАМИ ИЗ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ МЕТАКРИЛАТА ДЛЯ ТЕХНОЛОГИИ БЕЛКОВЫХ БИОЧИПОВ

Штылев Г.Ф., Левашова А.И., Бутвиловская В.И., Чудинов А.В.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991, Москва, ул.Вавилова,32,
e-mail:gosha100799@mail.ru

В методе белковых биочипов набор белков-зондов иммобилизован в ячейках чипа по заранее заданным координатам, что позволяет проводить одновременно анализ проб по связыванию с иммобилизованными белками-зондами. Трехмерные гидрогелевые ячейки из «щеточных» полимеров, у которых полимерные цепи закреплены на подложке одним концом и не связаны между собой, могут обеспечить высокую емкость ковалентной иммобилизации молекулярных зондов и быструю кинетику связывания с комплементарными белками-мишенями. Ячейки из «щеточных» полимеров, полученные из полиэтиленгликольметакрилата могут минимизировать неспецифическую сорбцию белков-мишеней и увеличить чувствительность и специфичность анализа.

В данной работе в качестве подложки биочипа использовали не дорогой прозрачный полиэтилентерефталат (ПЭТ). Однако низкая реакционная способность не позволяет прививать щеточные полимеры на поверхности ПЭТ. Для функционализации, поверхность ПЭТ методом центрифугирования покрывали фотоактивной полимерной плёнкой, в состав которой входит поливинилацетат и бензофенон. На следующем этапе на поверхность подложки наносили водный раствор полиэтиленгликольметакрилата и облучали ультрафиолетовым светом (λ=254 нм) через фотомаску из кварцевого стекла. После УФ облучения на поверхности ПЭТ в соответствии с фотомаской получали микроячейки, состоящие из «щёточных» полимеров полиэтиленгликольметакрилата. Для ковалентной иммобилизации белков гидроксильные группы полимеров активировали с помощью N,N'-дисукцинимидилкарбоната (DSC). карбонилдиимидазола (CDI) или модифицировали янтарным ангидридом с последующей активацией водорастворимым карбодиимидом. Затем в ячейках иммобилизовали человеческий иммуноглобулин IgG, меченый флуоресцентным красителем Cy3. Иммобилизацию белков подтвердили методом флуоресцентной микроскопии. Лучшие результаты получили с активацией ячеек DSC (рис.1). Соотношение сигнал/фон на канале Cy3 составило 40. Функциональность иммобилизированных молекул подтверждали иммунохимическим анализом с античеловеческими козлиными антителами, маркированными флуоресцентным красителем Cy5. Соотношение сигнал/фон на канале Cy5 составило 67 .

Чипы с ячейками из полиэтиленгликольметакрилатных «щёточных» полимеров перспективны для иммунохимического анализа маркерных белков –мишеней.

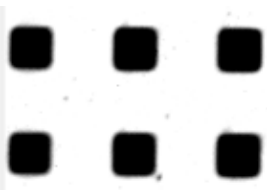


Рис.1. *Флуоресцентное изображение чипа на канале Cy3*

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 20-14-00287-П

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ L-ГАЛАКТОНОЛАКТОНДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *TRYPANOSOMA CRUZI*

Щеголев В.О.[а], Веселовский А.В.[б], Кудряшова Е.В.[а]

[а]МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы 1с3, e-mail: v@sheg.cc
[б]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская 10с8

Болезнь Шагаса, или *американский трипаносомоз*, — инфекционное заболевание, вызываемое простейшим *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Заболевание эндемично для сельских районов Латинской Америки и передаётся кровососущими насекомыми. Без лечения острая фаза переходит в хроническую; ВОЗ оценивает количество смертей в ~10 тыс/год. В настоящее время два препарата (нифуртимокс и бензнидазол) используются для лечения этого заболевания, однако, они вызывают серьезные побочные реакции, малоэффективны в хронических случаях, к ним возникает резистентность. Поэтому существует потребность в создании новых, безопасных, эффективных и доступных препаратов.

Фермент L-галактонолактондегидрогеназа из *T. cruzi* (TcGAL) активен (EC 1.3.2.3) на последнем этапе биосинтеза витамина С в паразите. Люди получают весь витамин С из пищи, но паразит *T. cruzi* полагается только на его эндогенный синтез и не способен поглощать витамин из вне. Это делает TcGAL потенциальной мишенью для новых лекарств.

TcGAL — мембранотропен, что затрудняет его изучение *in vitro*, однако, в нашей группе удалось воспроизвести естественное окружение, введя фермент в мицеллярную систему. Последнее позволяет изучать функции и кинетические свойства фермента с различными комбинациями субстратов и ингибиторов. Однако, структуру TcGAL затруднительно определить традиционными методами (РСА, ЯМР, крио-ЭМ).

Цель данной работы состоит в конструировании и валидации 3D-структуры TcGAL, необходимой для его изучения *in silico*. Структура апофермента TcGAL была предсказана с использованием нейросетевого подхода AlphaFold 2, классическое гомологичное моделирование затем было применено для включения структуры кофактора в полость внутри белка. Молекулярная динамика (МД) была использована для исследования конформационного пространства и гибкости TcGAL в водной среде. Молекулярным докингом против набора нескольких конформаций TcGAL был изучен тоннель, ведущий к активному центру белка; идентифицированы центры связывания известных субстратов и ингибиторов. Наконец, проведён ряд уточнений модели: оценена ёмкость буферного раствора, используемого в мицеллярной системе, для учета изменения pH во время реакции; также проведено сравнение силовых полей для моделирования холофермента TcGAL, сконструированы параметры для входящего в него кофактора FAD.

Результаты расчётов валидированы через сравнение с экспериментальными данными и показали согласие, что подтверждает надёжность полученной 3D-структуры. Модель будет улучшена для учета мембранных эффектов. Структура фермента будет использована для поиска новых ингибиторов.

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

RHODOTORULA TORULOIDES FERMENTATION BY ADHESION TO THE SURFACE OF MAGNETIC NANOPARTICLES FOR INVERTASE PRODUCTION

Alonso Estrada D. [a], Ramos González R.[b], Núñez Caraballo A. [a], Segura Ceniceros E.P.[a], Chávez González M.L. [a], Govea Salas M. [a], Michelena Álvarez L.G.[c], Neira Vielma A.A.[a], Ilina A. [a]

[a] Nanobioscience Group, Faculty of Chemical Sciences, Autonomous University of Coahuila.
e-mail: annailina@uadec.edu.mx
[b] CONACYT – Autonomous University of Coahuila
Blvd. V. Carranza e Ing. J. Cárdenas C., Col. República, CP¨25290, Saltillo, Mexico
[c] Biotechnology Department, Cuban Institute for Research on Sugar Cane Derivatives, Vía Blanca # 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, 11000 C. Habana - Cuba

The goal of the present study was to compare the production of the invertase from *Rhodotorula toruloides* in the fermentation process in the presence and absence of chitosan-coated magnetic manganese ferrite (MnFe2O4) nanoparticles (Ch-MNP).

Rhodotorula toruloides fermentation assays were carried out by submerged fermentation and by adhesion to the surface of Ch-MNP [1], applying a response surface design (BOX-BEHNKEN). Three levels of the substrate (sucrose) (30, 50, 70 g/L), Ch-MNP concentration (0, 1, and 2 mg/mL), and fermentation time were evaluated to define the effect of these factors on enzymatic activity and microorganism growth. Fermentation assays were carried out by reusing *R. toruloides* biomass immobilized on Ch-MNP at 1 mg/mL and adding 0.25 mg/mL in each reuse cycle.

In the *Rhodotorula toruloides* fermentation by adhesion to the surface of Ch-MNP the growth of the microorganism was stimulated. A more significant effect was observed at 2 mg/mL. A higher invertase activity was detected in the presence of Ch-MNP at 1 mg/mL. A similar enzymatic activity was seen in the first fermentation and after the third and fourth cycles of reuse of biomass immobilized on Ch-MNP at 1 mg/mL with the addition of 0.25 mg/ml in each process.

Fermentation by adhesion to the surface may be an appropriate method to improve *Rhodotorula toruloides* invertase production, allowing the possibility of biomass reuse in fermentation cycles.

References

1. Núñez Caraballo A., Iliná A., Ramos González,R., Aguilar C. N., Michelena Álvarez G., Carolina Flores Gallegos A., Sandoval-Cortés J., Aguilar-Gonzalez M. A., Soto-Cruz O.N., García García J. D., Martínez-Hernández J.L. *Frontiers in Sustainable Food System*, 2021, **5**, 683170, doi: 10.3389/fsufs.2021.683170

The study was supported by the FONCYT, project COAH-2022-C19-C019.

EFFECT OF MAGNETIC NANOPARTICLES ON THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *STREPTOMYCES GRISEUS* AGAINST PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISM

Farias Vázquez L.S.[a], Ramos González R.[b], Pacios Michelena S.[a], Aguilar C.N.[c], Arredondo Valdés R.[a], Rodríguez Herrera R.[c], Martínez Hernández J.L.[a], Segura Ceniceros E.P.[a], Iliná A.[a]

[a] Nanobioscience Group, Faculty of Chemical Sciences, Autonomous University of Coahuila. e-mail: annailina@uadec.edu.mx
[b] CONACYT – Autonomous University of Coahuila
[c] Food Research Department, Faculty of Chemical Sciences, Autonomous University of Coahuila, Mexico. Blvd. V. Carranza e Ing. J. Cárdenas C., Col. República, CP¨25290, Saltillo, Mexico

Food production is affected by diseases caused by phytopathogenic microorganisms. New techniques like biological control are being sought to combat these diseases. Bacteria of the genus *Streptomyces* sp. have been widely studied for their produced secondary metabolites. The present study aims to evaluate the antimicrobial activity of cell-free extracts produced by *S. griseus* in the presence and absence of different types of magnetic nanoparticles (NPs).

NPs ($MnFe_2O_4$) were synthesized with chitosan and ethylenediamine [1, 2]. The kinetics and isotherms of *S. griseus* adsorption on the NPs were evaluated. The interaction between NPs and *S. griseus* cells was studied by free cell counting in the Nuebauer chamber after the precipitation of the immobilized cells in an external magnetic field. Fermentation was carried out in the presence and absence of NPs, evaluating the antimicrobial activity of the extracts obtained after biomass separation against the phytopathogenic microorganism *Fusarium oxysporum*. The antimicrobial activity was expressed as a percentage of inhibition of radial growth of the fungus.

Adsorption equilibrium was observed at 3 h for the chitosan-coated NPs and at 3.5 h for the NPs with ethylenediamine. The adsorption isotherm was adjusted to the Freundlich and Langmuir models, respectively. The cell-free extracts obtained using NPs with ethylenediamine presented the highest inhibition of fungus radial growth (77.1%) compared with other extracts.

Magnetic NPs stimulate the production of compounds with antimicrobial activity in *S. griseus*. The interaction between cells and NPs, as well as antifungal activity, varies depending on their functionalization. The use of an external magnetic force allows an easy separation between the immobilized biomass and the suspension.

References

1. Núñez Caraballo A., Iliná A., Ramos González,R., Aguilar C. N., Michelena Álvarez G., Carolina Flores Gallegos A., Sandoval-Cortés J., Aguilar-Gonzalez M. A., Soto-Cruz O.N., García García J. D., Martínez-Hernández J.L. *Frontiers in Sustainable Food System*, 2021, **5**, 683170, doi: 10.3389/fsufs.2021.683170
2. Songvorawit N., Tuitemwong K., Tuitemwong P. *ISRN Nanotechnology*, 2011, ***2011***, ID 483129, doi: 10.5402/2011/483129.

The study was supported by the FONCYT, project COAH-2022-C19-C019.

ЗАО "НВО ИММУНОТЕХ"

Одна из ведущих российских компаний, производящих и реализующих диагностические иммуноферментные (ИФА) и иммунохроматографические (ИХА) наборы реагентов, качество проверенное годами 20 - летнего производства. Персонал ЗАО "НВО ИММУНОТЕХ" представлен учеными МГУ, институтов РАН, отраслевых НИИ и высококвалифицированными технологами, что обеспечивает высокий уровень научных разработок и позволяет осуществлять производство качественных диагностических наборов.

Комплексная система работы с потребителями, включающая как продажу диагностических наборов, так и консультации по методикам проведения анализов и интерпретации получаемых результатов. Обеспечение высококвалифицированными специалистами ЗАО "НВО ИММУНОТЕХ" подготовки кадров, технического и аналитического содействия, быстрого и компетентного ответа на вопросы, связанные с применением диагностических наборов.

Продукция ЗАО "НВО ИММУНОТЕХ"

ISO 13485:2016

НАБОРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ:

- статуса щитовидной железы;
- состояния системы репродукции человека;
- уровня стероидных гормонов и содержания онкомаркеров;
- иммунного статуса при аллергических состояниях;
- нефропатии на ранней стадии;
- антибиотиков(хлорамфеникол) в продукции животноводства и др.

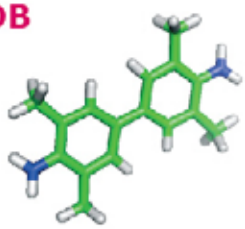
ТЕСТ-СИСТЕМА "ЭКОЛЮМ" ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

НАБОРЫ ОТЛИЧАЮТ ВЫСОКИЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ СВОЙСТВА:

- стабильность реагентов (срок хранения не менее года);
- простота и удобство процедуры проведения анализа (ссылка на видео курс: https://youtu.be/GHxReODjrCA), обеспеченные использованием:
  - стрипованных планшетов, разделяющихся на отдельные лунки;
  - полностью готовых к применению реагентов набора (раствор конъюгата, жидкие калибровочные пробы, субстратная смесь на основе ТМБ и пероксида водорода), не требующих дополнительной подготовки перед проведением анализа;
  - окрашенных реагентов, облегчающих процедуру проведения анализа и снижающих вероятность случайных ошибок.
- возможность проведения небольшого количества анализов в разные дни, поскольку все реагенты набора (конъюгат, калибровочные пробы) представлены в жидкой форме.
- возможность использования наборов в автоматических иммуноферментных анализаторах открытого типа;
- европейское качество по низкой цене;

ДЛЯ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ИФА НАБОРОВ

ОДНОКОМПОНЕНТНЫЙ СУБСТРАТНЫЙ ВОДНЫЙ РАСТВОР, СОДЕРЖАЩИЙ ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИН (ТМБ) И ПЕРОКСИД ВОДОРОДА, ПОЛНОСТЬЮ ГОТОВ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ.



Характеристика продукта: полное отсутствие органических растворителей, а также высокая активность и стабильность; сохраняет свои свойства при хранении в темноте при +4С^{o} в течение 1,5 лет.

Препарат расфасован в темные пластиковые флаконы по 14 мл, по 1 и 2 л.

ЗАО "НВО ИММУНОТЕХ"

г. Москва, 119234,

МГУ им. М.В. Ломоносова,

Ленинские горы, д. 1, стр. 10А

Тел.: +7 (495) 939-46-83

+7 (916) 836-58-23

immunotek@mail.ru

www.immunotek.ru

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ ЗАО “НВО ИММУНОТЕХ”

г. Москва, 119234, ГСП-1, МГУ имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, д. 1, стр. 10А
Тел.: +7 (495) 939-46-83; +7 (916) 836-58-23
immunotek@mail.ru www.immunotek.ru

Ассортимент, описание
01. ЗАБОЛЕВАНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Тиреотропный гормон (ИммуноФА-ТТГ) (0,05-25 мМЕ/л)
Свободный тироксин (ИФА-СвТ4-1)
Общий тироксин (ИФА-ТТ4-1)
Общий трийодтиронин (ИФА-ТТ3-1)
Свободный трийодтиронин (ИммуноФА-СвТ3)
Тиреоглобулин (ИФА-ТГ-1)
Антитела к тиреоглобулину (ИммуноФА-СвТ3)
Антитела к микросомальной фракции щитовидной железы (ИФА-АТ-МФТ-1)
Антитела к тиреопероксидазе (ИммуноФА-АТ-ТПО)
02. ГОРМОНЫ РЕПРОДУКТИВНОЙ СФЕРЫ
Пролактин (ИммуноФА-ПРЛ)
Тестостерон (ИммуноФА-ТС)
Прогестерон (ИммуноФА-ПГ)
17-оксипрогестерон (ИммуноФА-17ОН-ПГ)
Бета-субъединица хорионического гонадотропина человека (ИммуноФА-бета-ХГЧ)
Фолликулостимулирующий гормон (ИммуноФА-ФГС)
Лютеинизирующий гормон (ИммуноФА-ЛГ)
Эстрадиол (ИммуноФА-Эстрадиол)
Альфа-фетопротеин (ИммуноФА-АФП)
03. ГОРМОНЫ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ
Кортизол (ИФА-КОРТИЗОЛ)
Дегидроэпиандростерон-сульфат (ИммуноФА-ДГЭА-С)

04. ОНКОМАРКЕРЫ
Альфа-фетопротеин (ИммуноФА-АФП)
Общий специфический антиген предстательной железы (ИммуноФА-ПСА)
Свободный специфический антиген предстательной железы (ИммуноФА-СвПСА)
Общий специфический антиген предстательной железы-экспресс (ИммуноХА-ПСА-Экспресс)
Антиген СА 125 (ИммуноФА - СА 125), срок годности 15 мес.
Бета-субъединица хорионического гонадотропина человека (ИммуноФА-бета-ХГЧ)
05. АЛЛЕРГИИ
Общий IgE человека (ИммуноФА-IgE)
Специфический IgE человека на индикаторных полосках для 10 образцов сыворотки на 26 антигенов (ИммуноФА-Аллерген)
Специфический IgE человека на индикаторных полосках для 10 образцов сыворотки на 26 антигенов (ИммуноФА-Аллерген-2)
06. ПРОЧИЕ МАРКЕРЫ
Микроальбумин (ИммуноФА-Микроальбумин)
Антиген лямблий (Lamblia intestinalis) на индикаторных полосках (ИммуноХА-Лямблия-Экспресс), в 1 наборе 10 индикаторных полосок
Биосенсор-Эколюм (Минимальная партия 10 фл.)
07. КОНТРОЛЬ ОСТАТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ АНТИБИОТИКОВ В ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОВОДСТВА
Хлорамфеникол (Хлорамфеникол-ИФА)

РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ИФА	Количество
Стоп-реагент	15 мл
Однокомпонентный субстратный водный раствор, содержащий тетраметилбензидин (ТМБ) и пероксид водорода (H2O2), готовый к использованию, срок годности - 2 года	14 мл 1 л, 2 л
Иммуностаб (раствор для стабилизации конъюгатов антител с пероксидазой хрена в концентрированном виде)	1 л
Фосфатно-солевой буферный промывочный раствор для планшетов (концентрат x20)	1 л
Самоклеящиеся пленки для покрытия планшетов	1 шт.
Ванночки пластиковые для растворов для многоканальных пипеток 25 мл	1 шт.

Бесплатная доставка заказа при минимальной сумме заказа 35 000 (тридцать пять тысяч) рублей



БИОХИММАК

ЗАО «БиоХимМак»

119992 Москва, Ленинские Горы,
МГУ им. М.В. Ломоносова, д.1, стр.11

+7 (495) 647-27-40
+7 (495) 939-0997

info@biochemmack.ru

www.biochemmack.ru

БиоХимМак более 30 лет успешно занимается оснащением научных и медико-диагностических лабораторий современным и инновационным оборудованием. Принципы работы по международным стандартам сертификации качества обеспечивают высочайший уровень научной, инженерной и технической поддержки от специалистов компании БиоХимМак.

Акцент компании сосредоточен на качестве продукции и достижении успеха нашими пользователями. Это позволяет организации постоянно развиваться и получать самые высокие оценки от заказчиков, партнеров, сотрудников и акционеров.

Компания работает с ведущими российскими и зарубежными производителями научного и медицинского оборудования. Со спектром своей собственной продукции и продукции компаний-партнёров (более 50 000 наименований), БиоХимМак обслуживает более 5000 диагностических и исследовательских лабораторий в России и странах СНГ. Среди брендов, представляемых компанией на российском рынке присутствуют ведущие мировые и отечественные производители:

Beckman Coulter, ThermoFisher Scientific, Евроген, QIAGEN, Амплисенс, Bio-Rad, Тест-Ген, Agilent, MRC Holland, ProZyme, TransGen Biotech, БиоЛабМикс, Elabscience и др.

БиоХимМак постоянно пополняет портфель продукции новыми качественными товарами, чтобы вы могли заниматься медицинской и научно-исследовательской деятельностью, не отвлекаясь на долгие поиски необходимых вам приборов, реагентов и расходных материалов.

МЫ УВЕРЕНЫ, ЧТО НАШЕ ВЗАИМНОЕ СОТРУДНИЧЕСТВО СТАНЕТ ОБЩИМ ПУТЁМ К РЕАЛИЗАЦИИ САМЫХ СМЕЛЫХ ИДЕЙ!